

**ÉTUDE DE RELATION STRUCTURE-ACTIVITÉ D'UN INHIBITEUR DE L'ENZYME
PACE4 COMME TRAITEMENT DU CANCER DE LA PROSTATE**

par

Alexandre Foh-Dion

Mémoire présenté au Département de chimie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, Avril 2019

Le 17 avril 2019

*le jury a accepté le mémoire de Monsieur Alexandre Foh-Dion
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Yves Dory
Directeur de recherche
Département de chimie

Professeur Robert Day
Codirecteur de recherche
Département de chirurgie - urologie

Professeur Brigitte Guérin
Évaluateur interne
Département de médecine nucléaire et radiobiologie

Professeur Éric Marsault
Président-rapporteur
Département de pharmacologie - physiologie

SOMMAIRE

Le cancer est en tête de file des causes de décès au Canada où l'on estime que près de 30% des décès sont attribuables à cette maladie. Le cancer de la prostate est l'un des types de cancer les plus importants -le plus prévalent chez l'homme- et ses traitements actuels sont invasifs, coûteux ou encore peu efficaces sur le long terme, d'où la nécessité de trouver de nouvelles approches thérapeutiques. Notre équipe a démontré que la proprotéine convertase PACE4 est surexprimée dans les adénocarcinomes prostatiques et qu'elle est essentielle à la progression tumorale. L'inhibition de cette enzyme permettrait donc d'augmenter significativement la durée et qualité de vie des patients. Des études SAR (Structure Activity-Relationship) préalables nous ont permis de concevoir un inhibiteur peptidique (le peptide Multi-Leu) ayant une excellente affinité contre la PACE4 et une efficacité *in vivo* démontrée sur des modèles de souris xénogreffées. Multi-Leu étant de nature peptidique, il est très susceptible à la dégradation par les protéases endogènes si bien que sa stabilité s'avère insuffisante pour en faire un composé viable dans un contexte clinique.

Le présent ouvrage est divisé en deux sections : il sera d'abord question de nos travaux de SAR visant à préserver les paramètres pharmacocinétiques viables de notre tête de série originale tout en améliorant sa stabilité métabolique. Ces travaux ayant démontré à plusieurs reprises des valeurs de K_i de l'ordre du nM en essai enzymatique, mais une faible activité antiproliférative chez les lignées de cellules cancéreuses exprimant PACE4, nous avons étudié l'hypothèse d'une faible perméabilité métabolique via des essais PAMPA et par cycométrie de flux (FACS).

Nos efforts nous ont permis d'améliorer significativement le profil pharmacocinétique de notre composé peptidomimétique, nous amenant un pas plus près d'un traitement novateur du cancer de la prostate.

Mots clés : PACE4, Cancer, Prostate, Proprotéine convertase, Inhibiteur, Peptidomimétique, Relation structure-activité

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Pr Yves Dory, et mon codirecteur, le Pr Robert Day, de m'avoir laissé entrer le pharmacologue que j'étais à l'époque dans un laboratoire de synthèse chimique. C'était un pari pour le moins audacieux qui, je le crois sincèrement, a été hautement bénéfique dans un sens comme dans l'autre. Notre bagage et nos perspectives différentes ont donné naissance à des échanges enrichissants; source de plusieurs réponses et surtout de nouvelles questions. Une curiosité et un intérêt s'élargissant à plus qu'une simple spécialisation restent à mon sens la clé des grandes avancées scientifiques.

Je souhaite tout spécialement remercier la docteure Anna Kwiatkowska pour les heures incalculables qu'elle a passé à faire et parfaire ma formation de chimiste. Il va sans dire que les connaissances et compétences que j'ai acquises au cours des deux dernières années sont inestimables, mais avant tout je crois avoir appris d'elle une rigueur au travail et un souci du détail d'autant plus importants.

Je garde un souvenir très positif du temps partagé avec mes collègues des laboratoires Day et Dory. Un merci particulier à Pauline Navals, Jean-Louis Beaudeau, Vahid Dianati, Thomas Marmin et Frédéric Couture pour nos discussions et leurs judicieux conseils. Merci également à tous les autres étudiants-chercheurs que j'ai côtoyés, notamment Laura Mourot, Niousha Nazari, Thi-Minh Hue Tran, Victoria Laroche, Hui Xiao, Weizheng Fan, Kevin Ly, Frédérik Dufour, Anita Bakrania, Amanda Toupin et Nawel Mekdad. Je remercie aussi les stagiaires Zohra Boussouf et Alida Fagang Tchouanmou pour leur aide dans le laboratoire. Je tiens aussi à remercier les assistantes de recherche Sandra Gagnon et Roxane Desjardins ainsi que les stagiaires Nicolas Dory et Anabelle Ethier pour leur assistance dans l'acquisition des résultats biologiques. Je tiens également à souligner l'appui de Pierre-Luc Boudreault et Louis-Philippe Morency avec les logiciels de modélisation, de Christian Comeau avec les protocoles de perméabilité artificielle, de Marc-André Bonin pour la plateforme de synthèse peptidique, de Leonid Volkov pour la cytométrie de flux et de Phenoswitch Biosciences pour la spectrométrie de masse.

J'aimerais également remercier la fondation Mon Étoile, Cancer de la Prostate Canada, les Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQS) et les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) pour

leur support financier. Leur appui est absolument essentiel afin de poursuivre nos péripéties scientifiques et d'obtenir ces résultats qui ont le pouvoir d'améliorer la qualité de vie de millions de personnes souffrant du cancer.

L'Université de Sherbrooke m'a accueilli en son sein durant mes dernières années de scolarité et je me souviendrai longtemps de la formation de qualité que j'y ai reçue. Je tiens donc à exprimer ma gratitude envers le personnel enseignant, le personnel de soutien et les membres du jury ayant la tâche de lire et évaluer le présent document.

J'aimerais finalement remercier ma famille pour le support qu'ils m'ont accordé durant toute la durée de mon parcours académique. Entre autres mon beau-père Michel pour m'avoir cédé le véhicule qui m'a permis de parcourir les quelque 80 000 km nécessaires à l'accomplissement de mes études graduées, mon père Rockson pour son soutien indéfectible, ma mère Louise-Marie pour ses conseils toujours avisés et ma fiancée Roxanne pour son appui inconditionnel et pour m'encourager à poursuivre mes rêves coûte que coûte.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	I
REMERCIEMENTS	II
TABLE DES MATIERES	IV
LISTE DES ABREVIATIONS	VI
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES FIGURES	X
INTRODUCTION	1
I.1 Le cancer	2
I.1.1 Approches thérapeutiques	4
I.1.2 Le cancer de la prostate	7
I.2 Les proprotéines convertases	9
I.2.1 La PACE4	10
I.3 Développement d'un inhibiteur	14
I.3.1 Les inhibiteurs peptidiques	15
I.3.2 La relation structure-activité	16
I.3.3 Profil pharmacocinétique	17
I.3.4 Essais pharmacodynamiques	20
I.3.5 Développement du C23	23
CHAPITRE 1 : OPTIMISATION DE LA STABILITÉ	26
1.1. Introduction	26
1.2. Approche bioisostérique	26
1.2.1. Modifications en C-terminal	28
1.2.2. Modifications en P2	32
1.2.3. Modifications en P3	34
1.2.4. Modifications du noyau leucine (P5-P8)	41
1.2.5. Modifications en N-terminal	43
1.2.6. Modifications combinées	50
1.3. Approche macrocyclique	57

1.4. Approche par greffe intrapeptidique.....	62
CHAPITRE 2 : IMPACTS DE LA SAR SUR LA PERMÉABILITÉ	66
2.1. Introduction.....	66
2.2. Essai de perméabilité artificielle (PAMPA)	69
2.3. Analyse par cytométrie de flux (FACS)	73
CONCLUSION GENERALE	78
REFERENCES ET NOTES	80
ANNEXE 1 : PARTIE EXPERIMENTALE	85
Remarques générales	86
ANNEXE 2 : TABLEAU DE CARACTÉRISATION DES COMPOSÉS PEPTIDIQUES	95
ANNEXE 3 : SPECTRES DE CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE	98
ANNEXE 4 : SPECTRES DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE	114

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2-CTC	Chlorure de 2-chlorotrityle (résine)
2-MeValAc ML	[Acide 2-méthylpentanoïque]-LLLRVK-Amba
3HH	[Acide 3-aminophénylacétique]-dL-[HoLeu]-L-[HoLeu]-R-[<i>tert</i> -Leucine]-K-Amba
3HN	[Acide 3-aminophénylacétique]-dL-[HoLeu]-L-[NorLeu]-R-[<i>tert</i> -Leucine]-K-Amba
3NH	[Acide 3-aminophénylacétique]-dL-[NorLeu]-L-[HoLeu]-R-[<i>tert</i> -Leucine]-K-Amba
3NN	[Acide 3-aminophénylacétique]-dL-[NorLeu]-L-[NorLeu]-R-[<i>tert</i> -Leucine]-K-Amba
3-MeValAc ML	[Acide 3-méthylpentanoïque]-LLLRVK-Amba
4-AMePhac ML	[Acide 4-aminométhylphénylacétique]-LLLLRVK-Amba
4-AMePhac 3ML	[Acide 4-aminométhylphénylacétique]-LLLRVK-Amba
4-AMePhac dML	[Acide 4-aminométhylphénylacétique]-dLLLLRVK-Amba
3-Apaa ML	[Acide 3-aminophénylacétique]-LLLLRVK-Amba
3-Apaa 3ML	[Acide 3-aminophénylacétique]-LLLRVK-Amba
3-Apaa dML	[Acide 3-aminophénylacétique]-dLLLLRVK-Amba
6-Cl-HOBt	Dihydrate de 6-Chloro-1-hydroxybenzotriazole
Ac	Acétyle
AHH	[Acide 4-aminométhylphénylacétique]-dL-[HoLeu]-L-[HoLeu]-R-[<i>tert</i> -Leucine]-K-Amba
AHN	[Acide 4-aminométhylphénylacétique]-dL-[HoLeu]-L-[NorLeu]-R-[<i>tert</i> -Leucine]-K-Amba
Ala, A	Alanine
Amba	4-amidinobenzylamide
ANH	[Acide 4-aminométhylphénylacétique]-dL-[NorLeu]-L-[HoLeu]-R-[<i>tert</i> -Leucine]-K-Amba
ANN	[Acide 4-aminométhylphénylacétique]-dL-[NorLeu]-L-[NorLeu]-R-[<i>tert</i> -Leucine]-K-Amba
Arg, R	Arginine
Asp, D	Acide aspartique
C23	Ac-dLLLLRVK-Amba
CapAc ML	[Acide hexanoïque]-LLLRVK-Amba
CycloLeu ML	Ac-dLLLLR-[Acide 1-aminocyclopentanoïque]-K-Amba
Cys, C	Cystéine
DCM	Dichlorométhane

DIPEA	Disopropyléthylamine
DiPhac ML	[Acide diphenylacétique]-LLLRVK-Amba
DiPhac dML	[Acide diphenylacétique]-dLLLRVK-Amba
DLeu, dL	D-leucine
DMF	N,N-Diméthylformamide
DML-Agm	Ac-dLLLLRVK-[Agmatine]
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMTMM	Chlorure de 4-(4,6-diméthoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-méthyl-morpholinium
DNMeVal ML	Ac-dLLLLR-[N-Me-Val]-K-Amba
DOrnAmba ML	Ac-dLLLLRV-[Ornithine]-Amba
DTle ML	Ac-dLLLLR-[<i>tert</i> -leucine]-K-Amba
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
Gly, G	Glycine
H ₂ O	Eau
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HoLeu	Homoleucine
HomoCycloLeu ML	Ac-dLLLLR-[Acide 1-aminocyclohexanoïque]-K-Amba
HPLC	Chromatographie en phase Liquide Haute Performance
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
Ile, I	Isoleucine
IsoCap ML	[Acide 4-méthylpentanoïque]-LLLRVK-Amba
IsoVal ML	[Acide 3-méthylbutanoïque]-LLLRVK-Amba
K _i	Constante d'inhibition
Leu, L	Leucine
Lys, K	Lysine
Me	Méthyle
MeOH	Méthanol
ML	Ac-LLLLRVKR
MLAgm	Ac-LLLLRVK-[Agmatine]
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
Mpa	Acide 3-mercaptopropionique

Mpa3LC	MpaLLLRCK-Amba (analogue cyclique)
MI-1148	[4-(guanidinométhyl)phenylacétyl]-R-[<i>tert</i> -Leucine]-R-Amba
NMeVal ML	Ac-LLLLR-[N-Me-Val]-K-Amba
NMP	N-Méthyl-2-pyrrolidone
NorLeu	Norleucine
O/N	Toute la nuit
OrnAmba ML	Ac-LLLLRV-[Ornithine]-Amba
PC	Proprotéine convertase
Phac ML	[Acide phénylacétique]-LLLRVK-Amba
Phac dML	[Acide phénylacétique]-dLLLLRVK-Amba
Phe, F	Phénylalanine
Pro, P	Proline
PyBOP	Hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium
RMN	Résonance magnétique nucléaire
Ser, S	Sérine
SFTI-1	Sunflower trypsin inhibitor
SPPS	Synthèse peptidique en phase solide
$t_{1/2}$	Temps de demi-vie
Tle ML	Ac-LLLLR-[<i>tert</i> -Leucine]-K-Amba
TFA	Acide trifluoroacétique
TIPS	Triisopropylsilane
tPSA	Aire totale de la surface polaire («total polar surface area»)
Val, V	Valine
ValAc ML	[Acide pentanoïque]-LLLRVK-Amba
X	Désignation générale pour un acide aminé

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Bénéfices et effets secondaires des principaux traitements anticancéreux	6
Tableau 2. Comparaison des valeurs d'affinité enzymatique, d'activité antiproliférative et de stabilité métabolique de ML, C23 et dérivés	24
Tableau 3. Comparaison des valeurs d'affinité enzymatique, d'activité antiproliférative et de stabilité métabolique des analogues modifiés en P1 avec C23	30
Tableau 4. Comparaison des valeurs d'affinité enzymatique, d'activité antiproliférative et de stabilité métabolique de l'analogue macrocyclique Mpa3LC avec C23	61
Tableau 5. Valeurs d'inhibition enzymatique et d'activité antiproliférative de l'analogue macrocyclique 4L-SFTI TB et C23	65
Tableau 6. Inhibition enzymatique des inhibiteurs tronqués basés sur C23	67
Tableau 7. Inhibition enzymatique et activité antiproliférative des inhibiteurs tronqués basés sur ML.	68
Tableau 8. cLogP des analogues FITC versus les analogues correspondant, sans FITC.....	74

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Proportion des décès attribuables au cancer et à d'autres causes au Canada.....	1
Figure 2. Les 6 caractéristiques du cancer (Hanahan & Weinberg, 2000).....	3
Figure 3. Transcription et traduction de l'ADN en peptide	3
Figure 4. Pourcentage de cancer de la prostate par rapport aux autres cas de cancers	7
Figure 5. Quelques exemples de médicaments anti-cancéreux.....	8
Figure 6. Activation de la proinsuline par l'action de PC1/3 et PC2 (Goodman & Gilman's : The Pharmacological Basis of Therapeutics 12e ed.).....	9
Figure 7. Niveaux d'expression relatifs d'ARNm des PCs chez des tissus prostatiques normaux et tumoraux (D'Anjou <i>et al.</i>).....	11
Figure 8. Prolifération de lignées cellulaires de cancer de la prostate avec ou sans inhibition d'expression de PACE4 (D'Anjou <i>et al.</i>)	11
Figure 9. Prolifération de cellulaires LnCAP, knockdown pour une PC spécifique (Couture <i>et al.</i>)	12
Figure 10. Effets de la perméabilité sur l'activité antiproliférative (Levesque <i>et al.</i>).....	13
Figure 11. Quelques options de modifications peptidomimétiques du lien amide	16
Figure 12. . Exemple de graphique obtenu par essai enzymatique permettant de déterminer une valeur de Ki	21
Figure 13. Plaque d'essai MTT (haut) et molécules de MTT et de Formazan (bas)	22
Figure 14. Inhibiteur de PACE4 Multi-Leu (ML) et C23	23
Figure 15. Analogues bioisostériques d'un agoniste delta opioïde avec stabilité plasmatique	27
Figure 16. L'arginine en P1 de RVKR effectue trois contacts polaires au niveau de D167, Y211 et E139. (Modèle par homologie de Manuel E. Than).....	31
Figure 17. Analogue DOrnAmba ML, modifié en position P2.....	32
Figure 18. Histogramme comparatif des valeurs enzymatiques de certains analogues du scan en position P5 à P8.....	34
Figure 19. Comparaison des valeurs enzymatiques de ML versus un analogue modifié en P3.....	35
Figure 20. D160 de PACE4 vis à vis le résidu en P3 de RVKR. (Modèle par homologie de Manuel E. Than)	36
Figure 21. Structures de MI-1148 et analogues de C23 modifiés en position P3	38

Figure 22. Valeurs d'inhibition enzymatique et d'activité antiproliférative des analogues modifiés en position P3	39
Figure 23. Valeurs de stabilité plasmatique d'analogues modifiés en position P3	40
Figure 24. Histogramme comparatif des valeurs enzymatiques de certains analogues du scan en position P5 à P8.....	42
Figure 25. Structure des modifications apportées à C23 en position P8 et P9	45
Figure 26. Inhibition enzymatique croissante en fonction de la polarité (Kwiatkowska. A & A. Foh-Dion, résultats non-publiés)	46
Figure 27. Valeurs d'activité enzymatique, d'activité antiproliférative et de stabilité plasmatique des analogues modifiés en position P8	48
Figure 28. Valeurs d'activité antiproliférative et de stabilité plasmatique des analogues modifiés en position P9	50
Figure 29. Structure de l'inhibiteur AHN, un des 8 analogues à modifications combinées synthétisés .	51
Figure 30. Valeurs d'inhibition enzymatique et d'activité antiproliférative des analogues à modification combinées.....	53
Figure 31. Valeurs de stabilité plasmatique des analogues à modification combinées.....	55
Figure 32. Structure de la cyclosporine, un agent thérapeutique macrocyclique naturel	58
Figure 33. Structure du Crizotinib (à gauche) versus son analogue macrocyclisé, Lorlatinib (à droite)	59
Figure 34. Macrocyclisation de l'analogue Mpa3LC	60
Figure 35. Structure du vecteur peptidique SFTI-1	62
Figure 36. Structure et valeurs enzymatiques d'inhibiteurs de furine (Fittler <i>et al.</i>).....	62
Figure 37. Macrocyclisation de l'analogue 1, ML-SFTI (Ac-GLLRCKRSIPPICFPD).....	64
Figure 38. «Analogue macrocyclique #3» (4L-SFTI TB).....	65
Figure 39. Courbes d'activité antiproliférative des analogues C23 tronqués	67
Figure 40. Représentation schématisé de l'essai PAMPA	70
Figure 41. Histogramme des valeurs obtenues dans un essai PAMPA	72
Figure 42. Réaction de couplage avec FITC suivie de dégradation d'Edman sur un acide alpha-aminé	75
Figure 43. Résultats d'expérience de cytométrie de flux de ML-FITC et analogues tronqués	75

INTRODUCTION

La médecine a connu un essor fulgurant lors des dernières décennies. L'espérance de vie dans les pays industrialisés a donc considérablement augmenté depuis. Si on prend l'exemple du Canada, l'espérance de vie chez les hommes et les femmes a augmenté de plus de 20 ans durant le dernier siècle.^{1,2} Cette hausse massive est principalement due aux progrès en termes d'hygiène, ainsi qu'à ceux de la médecine face aux principales causes de décès de l'époque, telles les maladies infectieuses et la mortalité infantile. Le déclin de ce type d'afflictions a toutefois laissé place à plusieurs autres maladies telles que le diabète, les maladies cardiovasculaires et le cancer.³ Ces maladies existaient par le passé, mais leur prévalence s'est exacerbée de par notre mode de vie et les gains substantiels à notre espérance de vie.⁴ Dans la majorité des pays industrialisés, le cancer est la principale cause de décès. Si on reprend l'exemple du Canada, le taux de mortalité par cancer durant les dernières années oscillerait autour de 30%.^{5,6} Il serait légitime de se demander pourquoi le cancer reste si difficile à traiter malgré tous les progrès médicaux faits sur des maladies jugées autrefois mortelles ou incurables. La réponse se trouve principalement dans ce fait souvent oublié : ce qu'on appelle usuellement «le cancer» n'est pas une maladie, mais un regroupement de maladies aux causes et aux conséquences diverses. Ces cancers sont regroupés ensemble, car ils ont certaines particularités communes, mais chaque type de cancer est différent et représente un défi nouveau pour les chercheurs et les cliniciens (Figure 1).⁷

Proportion des décès attribuables au cancer et à d'autres causes, Canada, 2012

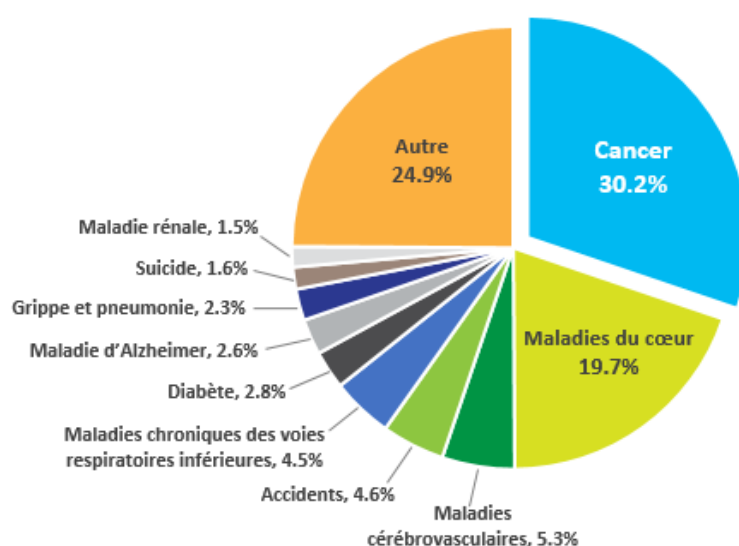


Figure 1. Proportion des décès attribuables au cancer et à d'autres causes au Canada

I.1 Le cancer

Le cancer est un type de maladie causé par une anomalie dans l'information génétique d'une cellule d'un organisme vivant. Dans un contexte normal, donc exempt de cancer, l'activité de la cellule est régulée par divers facteurs de croissance et messagers biologiques.⁷ Ces mécanismes ont pour rôle de s'assurer que la cellule n'enclenchera le processus de mitose -division cellulaire et unique moyen qu'a une cellule d'un organisme adulte de se multiplier- que dans des circonstances particulières et contrôlées.⁸ Dans le cas d'une cellule cancéreuse, son information génétique anormale lui permet de se soustraire à ce contrôle et de se répliquer indéfiniment.⁹ Cette prolifération cellulaire excessive aura éventuellement pour effet de former une tumeur, une masse de cellules n'assurant aucune fonction au sein de l'organisme, soit une masse de chair pompant les ressources de l'organisme pour s'accroître sans toutefois redonner quoique ce soit en retour. Par ailleurs, la tumeur peut compresser les organes avoisinants ou causer leur dysfonctionnement via d'autres mécanismes, ceci pouvant entraîner plusieurs complications, dont la mort. Une tumeur cancéreuse, soit une tumeur maligne, a également la propriété de former des métastases, tumeurs secondaires pouvant de propager et s'implanter ailleurs dans l'organisme.¹⁰ La gravité et la prévalence du cancer sont très claires et les traitements disponibles abondent. Ces options variées s'attaquent à des aspects différents de la croissance cellulaire. On peut résumer les propriétés d'une tumeur cancéreuse en six points importants : une prolifération indépendante de la présence de facteurs de croissance normaux, une résistance aux signaux biologiques limitant son développement, des mécanismes lui permettant de se soustraire à la mort cellulaire programmée (l'apoptose), une prolifération cellulaire infinie, la facilitation du processus d'angiogenèse (création de nouveaux vaisseaux sanguins, dans le cas présent pour alimenter la tumeur) et la formation de métastases (Figure 2).¹¹ Les mécanismes biologiques derrière la progression du cancer et ses propriétés intrinsèques sont la clé de la solution, car ces particularités les différenciant des cellules saines constituent des avenues potentielles afin de stopper la progression de la maladie. Chez les cellules saines comme chez les cellules tumorales, l'information génétique stockée dans l'ADN est transcrite sous forme d'ARN messager. L'information de cet ARN messager sera ensuite traduite par un organite de la cellule, le ribosome, afin d'accomplir la synthèse d'une protéine (Figure 3).¹² Chez les cellules cancéreuses, les protéines synthétisées auront pour effet d'accroître la prolifération de la tumeur ou de s'opposer aux mécanismes cellulaires pouvant réprimer sa prolifération excessive.

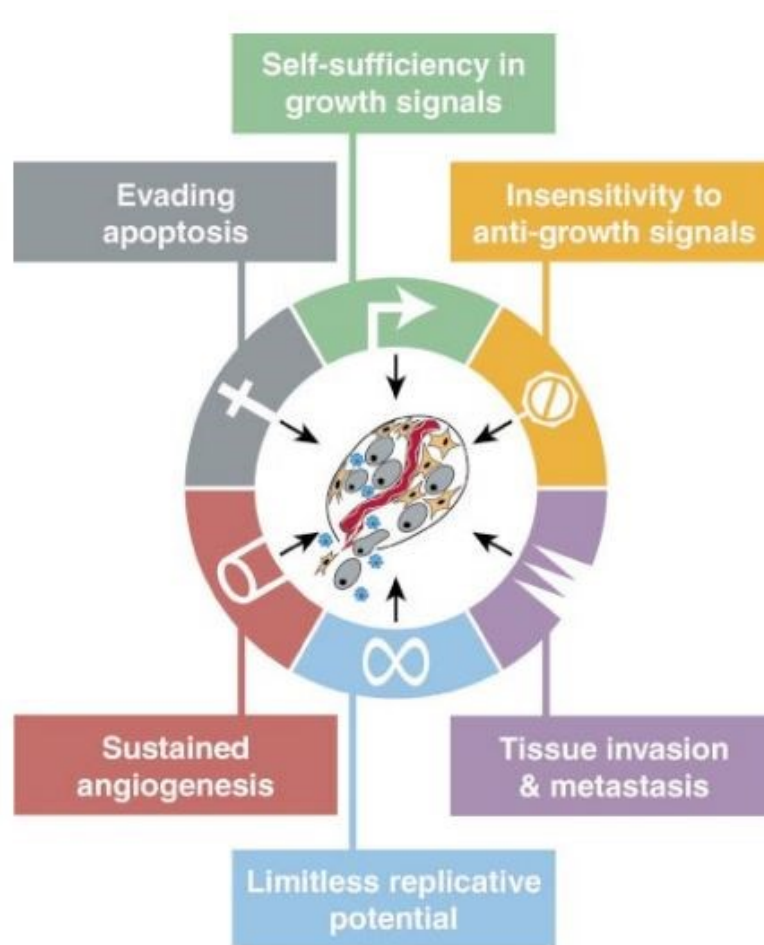


Figure 2. Les 6 caractéristiques du cancer (Hanahan & Weinberg, 2000)

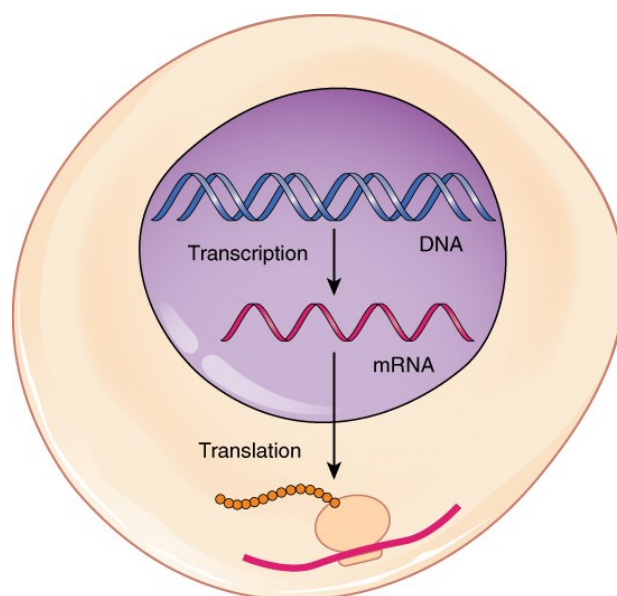


Figure 3. Transcription et traduction de l'ADN en peptide

I.1.1 Approches thérapeutiques

Le cancer étant causé par une modification, ou mutation, dans l'ADN d'une cellule, il semble raisonnable de percevoir l'ADN mutant comme une cible de traitement viable. Effectivement, la correction, voire l'élimination, de l'oncogène –section d'ADN responsable du caractère tumoral– permettrait de régler le problème à la source. Cette façon de procéder, la thérapie génique, comporte toutefois plusieurs inconvénients majeurs. En premier lieu, cette technique nécessite idéalement une façon de cibler spécifiquement l'oncogène, ce qui est loin d'être aisé.¹³ Certaines techniques, telle l'endonucléase Cas9 combinée à un ARN guide, permettent de cibler certains gènes spécifiques.¹⁴ En second lieu, l'ADN d'une cellule est situé au sein du noyau de cette dernière. Or la membrane nucléaire est une structure macromoléculaire imperméable à la majorité des traitements.¹⁵ Bref, les stratégies curatives reposant sur la modification génétique ne manquent pas, et ce chez virtuellement toutes les maladies, mais il s'agit d'une technique difficile d'application et aux effets secondaires potentiels importants.

Considérant la complexité de traiter le problème à la source, il serait envisageable de cibler l'opposé du spectre et s'attaquer à la tumeur elle-même. Il s'agit de l'approche largement utilisée à l'heure actuelle, la chirurgie étant un de ces traitements de première ligne. Les effets physiologiques de l'ablation chirurgicale de la tumeur sont essentiellement très simples, mais il s'agit d'une opération très invasive. Cette technique n'est certainement pas sans contraintes : elle s'avère peu efficace dans le cas de figure où le cancer a déjà produit des métastases ailleurs dans le système.¹⁶ Il faut également prendre en compte que les tumeurs et métastases sont parfois difficiles, voire impossibles à identifier à l'œil nu, ou alors dans une section de l'organisme inaccessible au chirurgien. Dans ces cas, il est nécessaire de se tourner vers d'autres options telles la chimiothérapie ou la radiothérapie. La chimiothérapie repose sur l'utilisation d'agents cytotoxiques dans le but de tuer les cellules cancéreuses et sont principalement basés sur l'hypothèse que les cellules cancéreuses prolifèrent plus rapidement que les autres. Certains traitements chimiothérapeutiques peuvent exploiter des différences que les cellules cancéreuses ont par rapport aux cellules saines afin d'aller chercher une certaine sélectivité et ainsi limiter la toxicité du traitement. Le Gemcitabine (Gemzar) par exemple est un médicament chimiothérapeutique bloquant la synthèse d'ADN, tuant par le fait même toute cellule amorçant le processus de mitose.¹⁷ Cependant, le

matériel génétique de la majorité des cellules cancéreuses est identique à celui des cellules saines, rendant l'identification de cibles spécifiques au cancer impossible. Comme les cellules cancéreuses ont un rythme de division beaucoup plus élevé que les cellules saines, ces dernières seront moins affectées par le traitement, mais ne seront pas à l'abri de la toxicité de ce dernier pour autant. La radiothérapie quant à elle repose sur l'utilisation de rayonnement ionisant afin de tuer les cellules cancéreuses. Ce rayonnement ionisant peut endommager la cellule de plusieurs façons, entre autres en générant des radicaux toxiques ou en induisant des cassures dans l'ADN menant à sa mort ou à une incapacité de se diviser davantage (mort mitotique).¹⁸ Les effets de la radiothérapie peuvent être amplifiés par des agents radiosensibilisateurs. La radiothérapie est un traitement qui ne discrimine pas très bien les cellules saines des cellules cancéreuses, la sélectivité du traitement reposant donc majoritairement sur le ciblage le plus précis possible de la zone affectée par la tumeur.¹⁹ Plus récemment, des traitements de radiothérapie ont été couplés à des anticorps ciblant des protéines surexprimées dans les cellules cancéreuses, améliorant la fenêtre thérapeutique des traitements de radiothérapie.

Pour ce qui est des options pharmacologiques, elles ont comme objectif de stopper la prolifération de cellules cancéreuses. Ces médicaments vont viser les cellules cancéreuses en exploitant les différences qu'elles ont avec les cellules saines. Par exemple, certains traitements vont chercher à bloquer l'activité des facteurs de croissance responsables de l'angiogenèse, limitant ainsi les ressources dont a besoin la tumeur pour croître. D'autres vont chercher à éliminer l'insensibilité des cellules cancéreuses à l'apoptose. Ceci peut être atteint via l'utilisation de plusieurs types de médicaments, dont les petites molécules ou les anticorps monoclonaux.²⁰

Une des particularités de la cellule cancéreuse est son ADN mutant qui code pour une protéine stimulant la croissance tumorale. Une des stratégies adoptées est donc de bloquer ou de limiter la synthèse ou l'activité de cette protéine oncogène. Dans cette gamme de traitement, on dénombre notamment les inhibiteurs de tyrosine *kinase* tels Imatinib (Gleevec) ou Sunitinib (Sutent) (Figure 5) dont le mode d'action repose sur l'inhibition de kinases catalysant des modifications protéiques post-traductionnelles potentiellement ontogéniques. Le principal effet secondaire associé à ces traitements est issu de sa sélectivité limitée. En effet, les modifications post-traductionnelles des protéines sont un phénomène ubiquitaire dans l'organisme et non pas réservé aux cellules cancéreuses. Considérant l'homologie interkinases, il est difficile de cibler uniquement les protéines kinase problématiques²¹.

Tableau 1. Bénéfices et effets secondaires des principaux traitements anticancéreux

Type de traitement	Bénéfices	Effets secondaires	Limitations
Chirurgie	-Retire rapidement la masse tumorale	-Complications postopératoires (variables selon type de cancer)	-Inefficace si métastases -Impossible si la tumeur est inaccessible
Chimiothérapie	-Haut taux de rémission	-Toxicité importante (fatigue intense, nausées, douleurs)	-Faible sélectivité et haute toxicité sont des limitations importantes
Radiothérapie	-Haut taux de rémission	-Toxicité (effets variables selon site irradié)	-Haute toxicité est une limitation importante
Traitement ciblé (pharmacologique)	-Limite la croissance des tumeurs	-Relativement faibles	-Limite la progression tumorale sans détruire le cancer -Peut promouvoir une résistance au traitement

On peut également bloquer l'activité de facteurs de croissance tumoraux. L'anticorps monoclonal Trastuzumab (Herceptin) est un exemple de ce type de médicament. HER2 est un récepteur cellulaire et facteur de croissance normal dont le rôle est évidemment de promouvoir la croissance cellulaire. Dans plusieurs cas de cancer du sein, ce récepteur acquiert une mutation augmentant massivement son expression. Le Trastuzumab a pour cible le récepteur muté auquel il va se lier afin d'en bloquer l'activité²². Cet exemple illustre deux éléments relativement récurrents du cancer et de ses thérapies. En premier lieu, le cancer est une maladie exploitant généralement des mécanismes normaux du corps, les amplifiant ou les réprimant à son avantage. En second lieu, ce ne sont pas tous les cancers du sein qui expriment ce récepteur muté, faisant de cette thérapie une option inutilisable dans certains cas. Cette variabilité entre les cancers explique en grande partie les divergences de réponse au traitement observées à travers tous les types de cancers.

I.1.2 Le cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est le type de cancer le plus prévalent chez l'homme. Selon les statistiques de la Société canadienne du cancer, 21% des nouveaux cas de cancer chez les hommes seront de ce type (Figure 4).²³ Il s'agit d'une maladie touchant majoritairement les hommes de plus de 65 ans, très peu de cas étant rapportés avant l'âge de 50 ans. Les principaux facteurs de risques de la maladie sont les antécédents familiaux et la consommation de viande rouge.²⁴

Pourcentage de tous les nouveaux cas de cancer estimés en 2017 chez les hommes

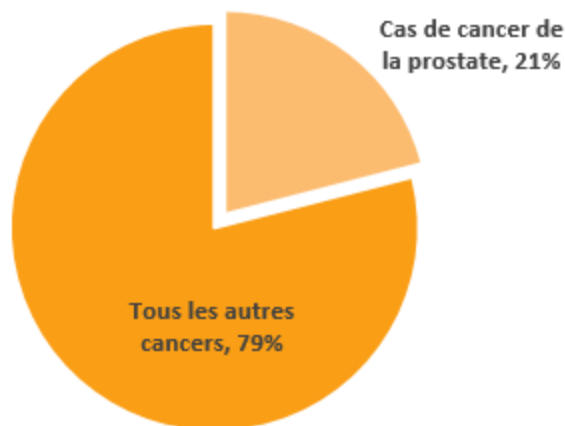
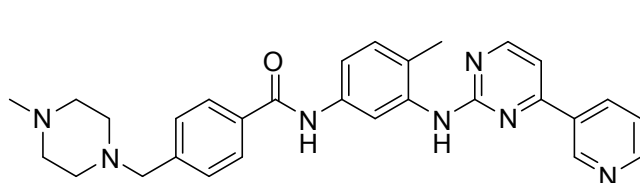


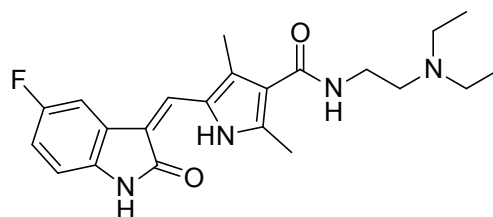
Figure 4. Pourcentage de cancer de la prostate par rapport aux autres cas de cancers

Les traitements de première ligne du cancer de la prostate sont similaires à ceux qu'on retrouve pour les autres types de cancer, soit la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. L'ablation chirurgicale de la prostate, la prostatectomie, comporte toutefois des complications postopératoires telles l'incontinence urinaire et la dysfonction érectile. Ces effets secondaires spécifiques peuvent également être retrouvés chez les patients traités par radiothérapie et, bien qu'ils ne soient pas mortels, ils constituent un désagrément considérable pour le patient²⁴. La toxicité importante des traitements de chimiothérapie ou de radiothérapie sont également des effets secondaires qui justifient la recherche de traitements novateurs. Ceci étant dit, bien que les effets secondaires soient une préoccupation sérieuse des chercheurs, il ne faut pas perdre de vue que le principal motif de demeure la résistance que la maladie développe envers les autres traitements de première ligne.

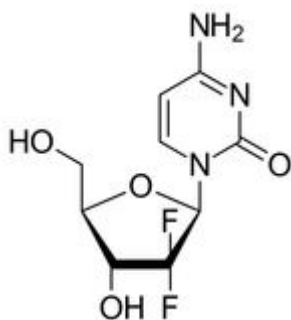
Un autre des traitements de première ligne spécifique au cancer de la prostate est la thérapie hormonale, ou hormonothérapie. Il s'agit d'une stratégie dans laquelle la synthèse d'androgènes ou la liaison de ces derniers avec leur récepteur est bloquée par un composé bioactif.²⁵ Ces médicaments anti-androgéniques induisent une «castration chimique» du patient qui permet de limiter la progression du cancer puisque les androgènes sont des hormones essentielles au développement de la tumeur. Le finastéride (Proscar) est un exemple de ce type de médicament dont le mode d'action repose sur l'inhibition de l'enzyme 5-alpha-réductase, responsable de la conversion de la testostérone en dihydrotestostérone et limitant par ce fait même les niveaux d'androgènes du patient. Une des principales limitations de cette méthode de traitement est qu'elle ne peut que limiter la progression tumorale et ne détruit pas le cancer.²⁶ Pour cette raison, elle est souvent combinée avec d'autres options, telles la prostatectomie, la chimiothérapie et/ou la radiothérapie. L'autre limitation importante vient du fait qu'une résistance au traitement vient à se développer chez le patient. En effet, le cancer progresse inévitablement vers un stade hormonal indépendant (ou hormono-résistant), soit un niveau où la présence d'androgène n'est plus essentielle à sa prolifération et où la thérapie hormonale n'a plus d'effet bénéfiques.²⁷ Le développement de cette résistance est la raison principale justifiant nos efforts de recherche.



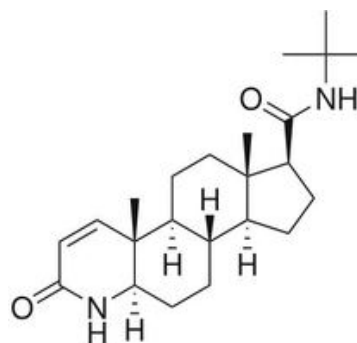
Gleevec



Sunitinib



Gemzar



Proscar

Figure 5. Quelques exemples de médicaments anti-cancéreux

I.2 Les proprotéines convertases

Les proprotéines convertases (PCs) sont des enzymes dont le rôle est l'activation d'autres enzymes et protéines. La majorité des protéines nécessitent une série de modifications post traductionnelles pour être actives et le clivage via une ou plusieurs PCs peut faire partie de ces modifications. Le rôle des PCs n'est certainement pas marginal : plusieurs des enzymes activées par les PCs ont un rôle physiologique charnière.²⁸ Par exemple, l'insuline, hormone responsable du métabolisme du glucose, est synthétisée sous forme de pro-insuline qui sera ensuite activée sous l'action des protéines convertases PC1/3 et PC2 (Figure 6).²⁹

À ce jour, 9 proprotéines convertases ont été identifiées.³⁰ Ces convertases ont deux nomenclatures interchangeables, ainsi les 9 PCs PCSK1 à PCSK9, peuvent être respectivement nommées : PC1/3, PC2, Furine, PC4, PC5/6, PACE4, PC7, SKI-1 et NARC-1.³¹ Ces enzymes ont en commun le fait qu'elles sont toutes des protéases à sérine capables d'activer d'autres protéines via clivage. Les sept premières ont une propension à cliver en aval de résidus basiques et ont une forte homologie à la hauteur du domaine catalytique. Ainsi, une séquence consensus R/K-X-X-R a été identifiée pour ces protéases.³²

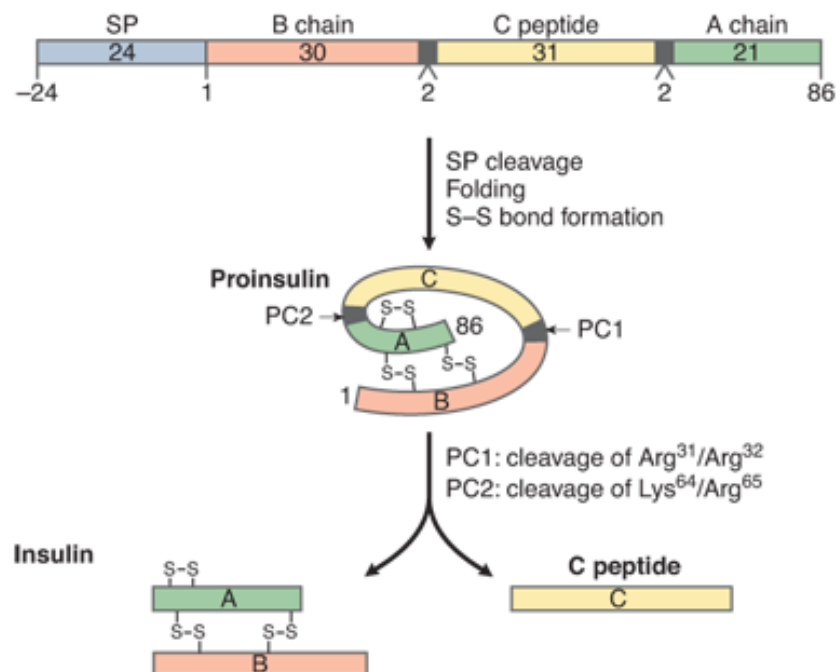


Figure 6. Activation de la proinsuline par l'action de PC1/3 et PC2 (Goodman & Gilman's : The Pharmacological Basis of Therapeutics 12e ed.)

Vu leur rôle déterminant dans la maturation de plusieurs protéines, il n'est pas étonnant de voir qu'elles sont impliquées dans le développement de plusieurs types de cancer. Une corrélation claire entre la surexpression de ces enzymes et certains types de cancer a été identifiée, par exemple la furine et PC2 dans le cas de cancer du poumon à petites cellules et PC1, PC2 et la furine chez des lignées cellulaires de cancer du pancréas.³³ Plus récemment, les proprotéines convertases ont trouvé des applications thérapeutiques dans l'hypercholestérolémie familiale. PCSK9 est une PC ayant la fonction de stopper le recyclage de récepteurs dont le rôle est de limiter le taux de LDL (low-density lipoprotein) sanguin. Son inhibition via des anticorps monoclonaux est donc une méthode efficace pour diminuer le taux de cholestérol.³⁴ Ces médicaments constituent une nouvelle classe de traitement contre l'hypercholestérolémie, tels evolocumab (Repatha) et alirocumab (Praluent). Leur mise en marché effectuée seulement 12 ans après la découverte de la protéine elle-même constitue un témoignage probant de l'intérêt des convertases comme cibles pharmacologiques.^{35,36}

I.2.1 La PACE4

Une corrélation entre l'expression de la proprotéine convertase PACE4 et la prolifération de lignées cellulaires de cancer de la prostate a été mise en lumière par les travaux d'Anjou *et al.* du laboratoire de Robert Day.³⁷ Cette corrélation observée est unique à la PACE4 et n'est pas retrouvée chez les autres PCs (Figure 7). Cette surexpression sélective suggère un rôle important de la PACE4 dans le cancer, mais n'est pas suffisante en soi pour conclure une relation de cause à effet. Cette avenue prometteuse a été investiguée plus en profondeur dans des modèles murins xénotransplantés où l'expression de PACE4 était réprimée par un ribozyme delta de type SOFA.³⁸ Il fut alors observé que la diminution de l'expression de PACE4 corrélait avec une diminution du rythme de croissance de la tumeur xénotransplantée, validant ainsi l'inhibition de PACE4 comme cible pharmacologique. D'Anjou *et al.* l'ont démontré via une lignée cellulaire n'exprimant pas PACE4 (4-2) et l'une l'exprimant (DU145) (Figure 8). Des études subséquentes de knock-down génétique, soit la création de souris transgéniques ne pouvant exprimer PACE4, en sont arrivées à la même conclusion, mais via une approche différente (Figure 9).³⁸

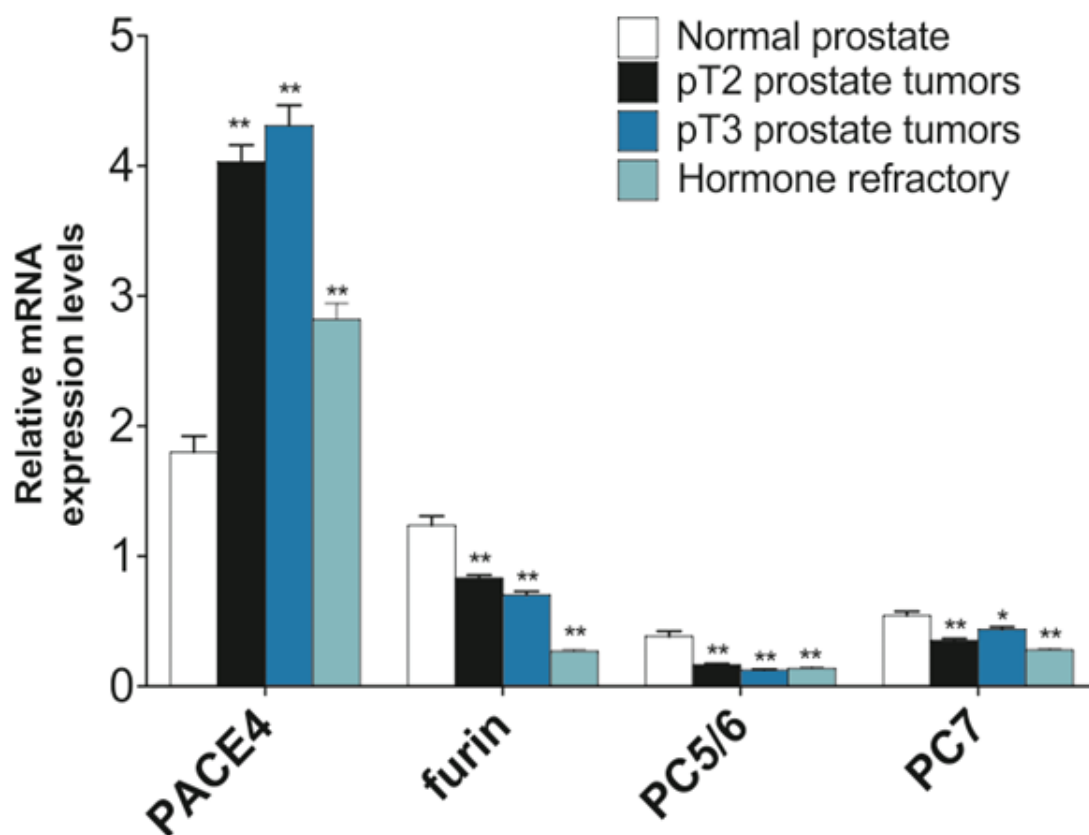


Figure 7. Niveaux d'expression relatifs d'ARNm des PCs chez des tissus prostatiques normaux et tumoraux (D'Anjou *et al.*)

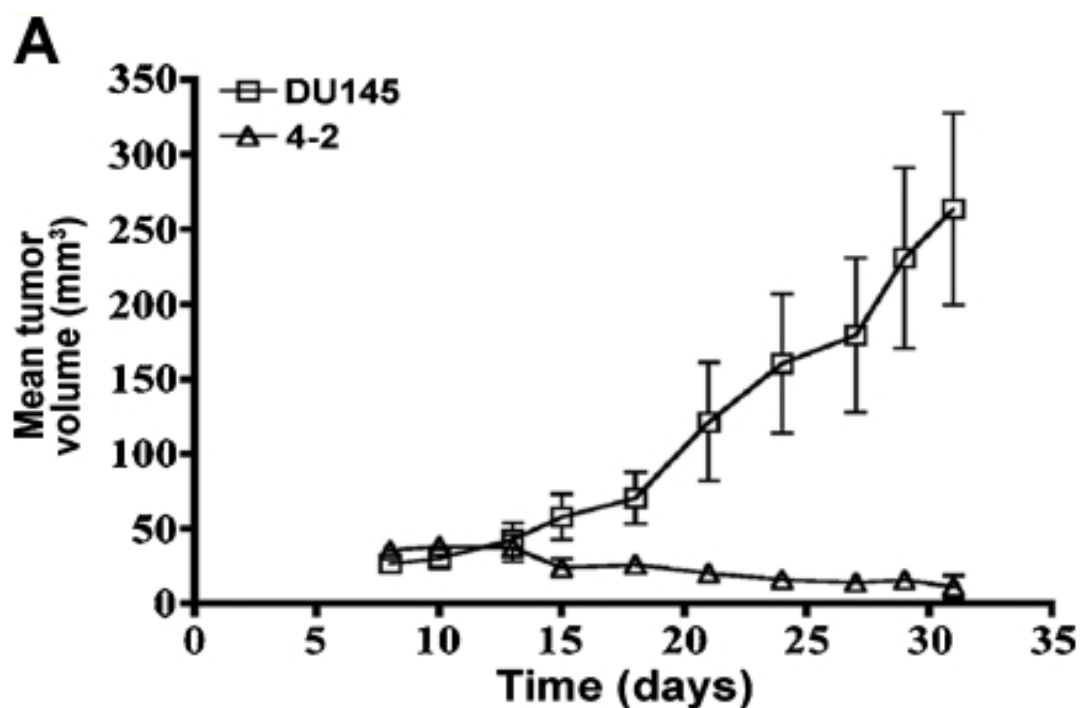


Figure 8. Prolifération de lignées cellulaires de cancer de la prostate avec ou sans inhibition d'expression de PACE4 (D'Anjou *et al.*)

Une autre observation importante à noter par rapport à PACE4 est qu'il s'agit d'une protéine à la fois exprimée de façon intra et extracellulaire. Levesque *et al.* ont exploré les propriétés de cette PACE4 intracellulaire versus extracellulaire via un inhibiteur de PACE4, le peptide Multi-Leu, auquel un polyéthylène glycol PEG8 a été attaché en N-terminal.³⁹ Cette modification peptidique n'a aucune incidence sur sa capacité à inhiber l'enzyme seule (Figure 10a), mais l'empêche d'entrer dans la cellule (Figure 10b). Des essais de prolifération subséquents sur des lignées de cellules cancéreuses ont démontré une inhibition nulle de la croissance tumorale (Figure 10c et d) chez le Multi-Leu modifié avec PEG8. La conclusion à tirer de ces expériences est que la perméabilité cellulaire de l'inhibiteur est essentielle à son activité antiproliférative et donc que la PACE4 intracellulaire est responsable de la progression du caractère cancéreux.

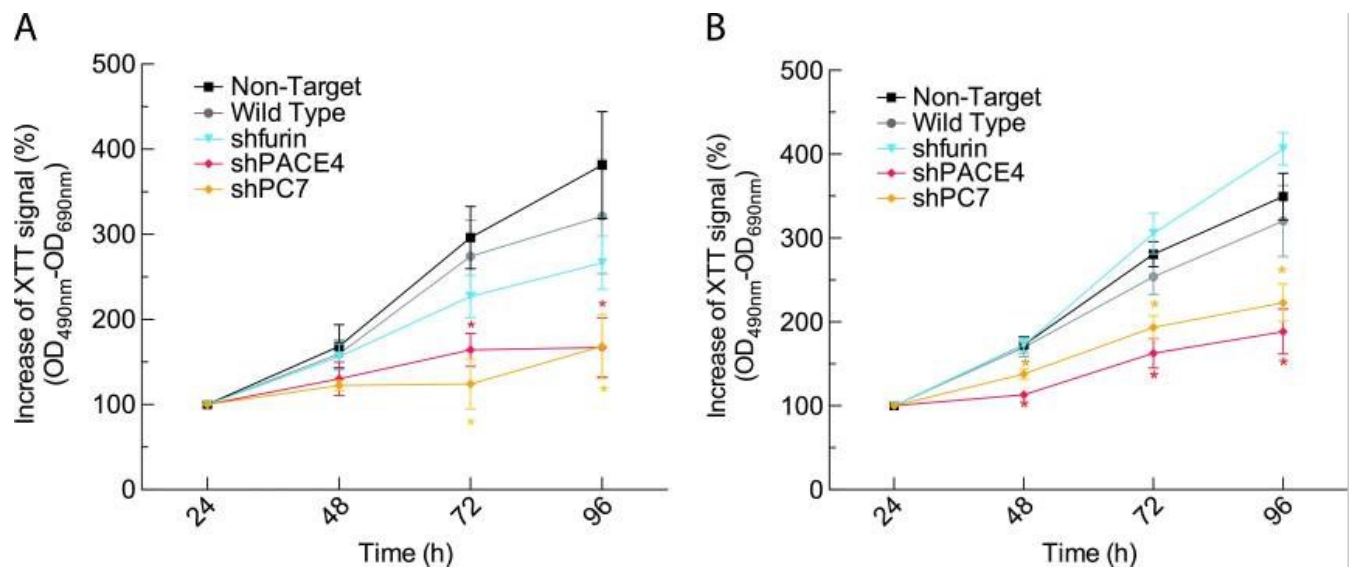


Figure 9. Prolifération de cellules LnCAP, knockdown pour une PC spécifique (Couture *et al.*)

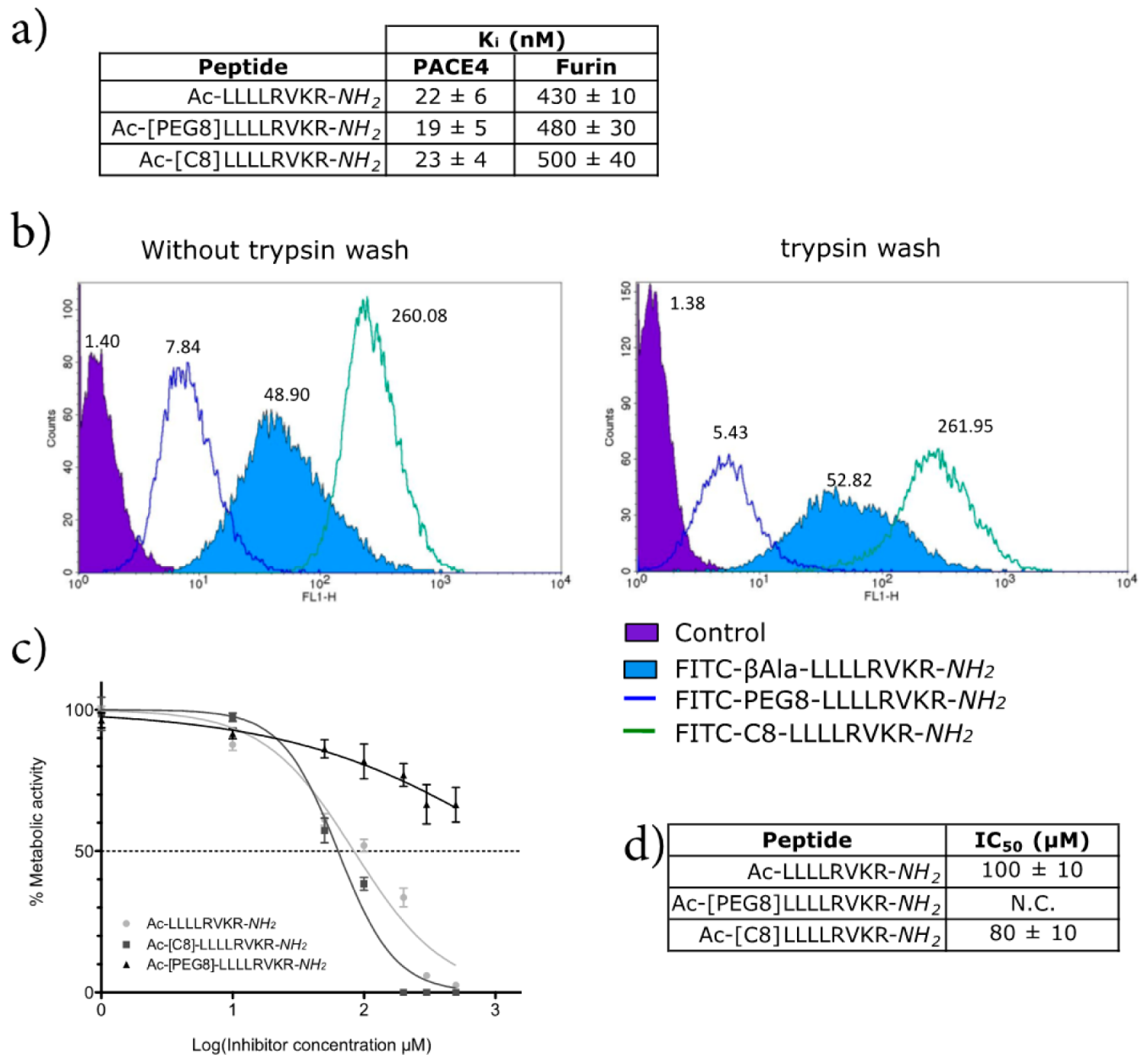


Figure 10. (Levesque *et al.*)

(a) Valeurs d'inhibitions équivalentes de la PACE4 chez des analogues de ML perméable et non perméables

(b) Rétention d'inhibiteurs de PACE4 variable selon la perméabilité de l'analogue

(c) (d) Les analogues de PACE4 perméables peuvent inhiber la prolifération de cellules cancéreuses

I.3 Développement d'un inhibiteur

La preuve étant faite que PACE4 est essentielle à la croissance du cancer de la prostate, nous sommes penchés sur une façon de cibler cette enzyme afin de créer une nouvelle avenue de traitement sélective pour cette maladie. Ceci constituerait une option supplémentaire aux traitements actuels qui comporterait beaucoup moins d'effets secondaires et qui pourrait être utilisée à tous les stades du cancer, contrairement à l'hormonothérapie. Toutefois, au même titre que l'hormonothérapie, l'inhibition de PACE4 ne permettrait pas de tuer le cancer. L'utilisation d'un inhibiteur ciblant PACE4 serait donc probablement faite conjointement avec un type de traitement pouvant tuer le cancer, un agent cytotoxique par exemple, mais permettrait de réduire considérablement les doses de ce dernier, et par ce fait même ses effets secondaires importants.

Les inhibiteurs pharmacologiques viennent sous plusieurs formes. Les principaux utilisés sont les anticorps et les petites molécules.³⁹ Ces dernières ont l'avantage d'avoir un profil de distribution et de métabolisme plus facile à optimiser.⁴⁰ Leurs bonnes absorption et stabilité par rapport aux autres lignes de traitement les rendent généralement administrables oralement, voie d'administration préférée par les cliniciens et les patients. Les anticorps quant à eux sont des protéines massives en comparaison aux petites molécules de moins de 500 daltons. Vu leur taille et leur faible stabilité, l'injection intraveineuse est généralement la seule voie d'administration possible pour ce type de traitement. Toutefois, les anticorps étant spécifiquement produits afin de détecter un antigène, soit la cible du traitement, leur affinité et leur sélectivité pour leur cible sont très grandes et leurs effets secondaires limités.⁴¹ Des études effectuées en parallèles à celle-ci ont toutefois démontré qu'ils ne constituaient pas une option valable dans le cas qui nous concernait. Notre cible a été identifiée comme intracellulaire et les anticorps ont une perméabilité cellulaire virtuellement nulle.⁴² Malgré la popularité et les avantages d'autres types d'inhibiteurs, nous avons opté pour la synthèse d'un inhibiteur de type peptidique, une avenue moins utilisée dans le développement de médicaments. Notre décision est basée sur plusieurs facteurs.

I.3.1 Les inhibiteurs peptidiques

Les inhibiteurs peptidiques sont principalement utilisés par l'industrie pharmaceutique en phase de recherche de «lead», car ils sont faciles à synthétiser. Il est ainsi possible de produire plusieurs centaines de peptides différents par chimie combinatoire afin d'identifier les groupements fonctionnels impliqués dans la liaison au site actif d'une cible. Une fois ces informations acquises, le modèle peptidique est souvent abandonné, et ce pour une raison majeure, soit la relative instabilité des peptides *in vivo*.⁴³ Les peptides et protéines sont abondants de façon endogène et le corps possède une quantité importante de peptidases aptes à les dégrader. Les inhibiteurs peptidiques constituent donc généralement un modèle utilisé comme outil exploratoire, sauf dans le contexte particulier de peptidomimétique. Bien qu'il s'agisse de leur usage majoritaire dans le domaine de l'industrie pharmaceutique, il ne faut pas perdre de vue que certains médicaments très importants, l'insuline par exemple, sont des peptides.

La peptidomimétique est la modification d'un peptide par une structure chimique possédant des propriétés physicochimiques similaires (isostère) de façon à conserver son activité biologique tout en le rendant plus difficile à reconnaître par les protéases.⁴⁴ Dans notre cas, une stratégie peptidomimétique est utilisée, car notre cible est une enzyme dont le substrat est un peptide, faisant ainsi du peptide un bon motif d'inhibiteur vu sa similitude au substrat endogène. Ceci nous assurerait qu'il puisse être facilement reconnu par la cible identifiée. Il est possible de modifier le peptide à la hauteur de la liaison peptidique, lien ciblé par les peptidases.

Les options peptidomimétiques sont nombreuses, mais aucune d'entre elles n'est efficace à tout coup, pouvant occasionner une perte d'affinité pour la cible ou un gain en stabilité nul. La permutation de l'isomérisation naturelle L pour l'isomérisation de type D permet d'éviter certaines protéases, mais l'orientation différente de la chaîne latérale peut être responsable d'une perte de compatibilité avec la cible. De la même façon, la N-méthylation d'un lien amide risque d'induire un coude bêta dans la structure tridimensionnelle du peptide, pouvant avoir un effet positif comme néfaste sur ses propriétés pharmacologiques.^{45,46} Une autre option d'ordre peptidomimétique est de modifier la chaîne latérale du peptide. En effet, plusieurs peptidases reconnaissent une séquence d'acides aminés spécifiques. En

modifiant la chaîne latérale par une alternative non naturelle, les peptidases peuvent avoir plus de difficulté à identifier leur cible, augmentant ainsi la stabilité métabolique du médicament (Figure 11).⁴⁷

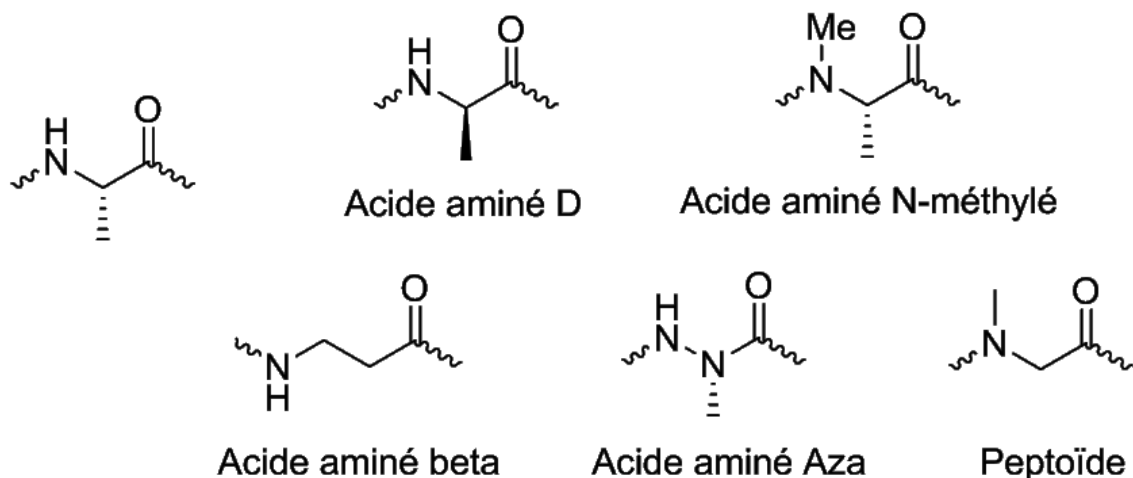


Figure 11. Quelques options de modifications peptidomimétiques du lien amide

I.3.2 La relation structure-activité

La relation structure-activité est une méthode qui permet de déterminer les liens potentiels entre la structure chimique d'une molécule et son activité biologique.⁴⁸ Dans cette optique, les groupements fonctionnels de la molécule étant impliqués dans la liaison au site actif de l'enzyme ou du récepteur sont décrits comme étant des pharmacophores. Ces pharmacophores sont essentiels à l'activité de la molécule, car ils sont le cœur de l'interaction entre la cible et son substrat.⁴⁹ La notion de pharmacophore vient toutefois à être remplacée par celle d'hyperforme, une vision plus holistique de la problématique. La molécule ayant souvent plusieurs points de contact spécifiques avec la cible, il ne suffit pas simplement d'avoir les bons pharmacophores, encore faut-il qu'ils soient aptes à se positionner adéquatement dans un environnement tridimensionnel afin de pouvoir interagir efficacement à leur point de contact. La taille du cœur de la molécule, la longueur des différents embranchements et la flexibilité relative de la molécule sont donc des facteurs tout aussi importants à considérer que l'utilisation du ou des bons pharmacophores.

Pour tenter d'améliorer les propriétés du composé, les pharmacophores peuvent être substitués par une série d'isostères. Un isostère, aussi appelé bioisostère dans un contexte biologique, est un groupement

fonctionnel qui peut en remplacer un autre au sein d'une molécule thérapeutique tout en préservant la même activité pharmacologique.⁵⁰ Un exemple typique est de remplacer un carboxyle, sous forme carboxylate à pH physiologique, par un tétrazole, qui possède également une charge négative à pH physiologique, permettant ainsi d'obtenir un produit qui se comportera de façon équivalente au niveau du site actif, mais qui peut s'avérer plus difficile à identifier par des enzymes.⁵¹ Les isostères sont utilisés pour augmenter la stabilité dans un contexte peptidomimétique, mais ne se limitent pas à l'amélioration de la stabilité : ils peuvent être utilisés afin d'optimiser virtuellement n'importe quelle propriété pharmacologique d'un composé.

I.3.3 Profil pharmacocinétique

Le corps humain représente un ensemble de réactions biochimiques multiples et hautement régulées. Il s'agit d'un environnement beaucoup plus complexe que n'importe quel essai *in vitro*. Ainsi, des résultats positifs dans ce type d'essai ne garantissent certainement pas un succès lors de la transposition du traitement chez l'être humain. L'effet que le corps a sur le médicament, souvent identifié par le nom de «pharmacocinétique», est un aspect important à prendre en compte lors de son développement.

La pharmacocinétique est souvent dépeinte comme étant un concept réciproque à celui de pharmacodynamique. On réfère souvent à la pharmacodynamique comme l'action du médicament sur le corps, soit l'affinité de la molécule pour sa cible et l'effet en découlant.²¹ Ce type de propriété est relativement simple à tester *in vitro*. La pharmacocinétique quant à elle fait référence à comment le corps va interagir sur la molécule, soit comment cette dernière sera absorbée, distribuée, métabolisée et excrétée du système.²¹ Il s'agit d'une série de concepts qui englobent beaucoup plus de processus.

L'absorption de la molécule est importante, car si la molécule n'est pas absorbée, elle ne pourra pas atteindre sa cible et prodiguer l'effet escompté. Il s'agit d'une propriété qui est souvent dépendante de sa perméabilité lors d'une administration par voie orale. Pour une molécule dont la cible est située à l'intérieur des cellules, il est nécessaire qu'elle puisse passer à travers la membrane cellulaire, une bicouche phospholipidique. Si la molécule est trop hydrophile, il est très probable qu'elle ne puisse pas traverser cette membrane hydrophobe.⁵² Or, rendre la molécule très hydrophobe n'est pas nécessairement une solution avisée considérant qu'elle devra circuler dans le flux sanguin, soit dans un

solvant hydrophile. Une molécule trop hydrophobe, souvent insoluble, possèdera non seulement une importante toxicité, mais sera impossible à tester dans ses essais biologiques, et de façon plus importante à administrer au patient. La molécule doit donc posséder un équilibre entre son caractère hydrophile et hydrophobe afin d'en faire un bon candidat clinique.⁵³

Une manière de mesurer l'hydrophilicité versus l'hydrophobicité d'une molécule est via le LogP, un coefficient de partage octanol/eau. On mesure la répartition d'une quantité connue du composé dans un mélange de ces deux solvants, puis on exprimera le résultat sous forme du logarithme du ratio des concentrations dans l'octanol versus l'eau.⁵⁴ Des études rétrospectives ont démontré que le LogP idéal pour l'absorption d'un médicament est dans la zone de 2 à 4.⁵⁵ Une variation du LogP, le LogD, existe où l'expérience tient compte du pH, ce type d'essai étant plus représentatif de la réalité.⁵⁶ Les appellations cLogP ou cLogD (ou encore «LogP ou LogD calculé») sont également utilisées et font référence à une prédiction, souvent informatique, du LogP ou du LogD de la molécule en se basant sur sa structure et groupements fonctionnels. Le concept de LogP ou LogD vient toutefois à être précisé par celui de tPSA (Topological Polar Surface Area). Comme son nom l'indique, il s'agit de la surface polaire de la molécule, chaque groupement polaire ajoutant à cette valeur.⁵⁷ Les études ont démontré qu'une tPSA supérieure à 140 Å est généralement associée à une faible perméabilité.⁵⁸ Cette mesure théorique semble a priori très similaire au LogD, mais comporte certaines spécificités importantes. Une molécule de plusieurs milliers de daltons pourrait avoir une bonne balance dans son hydrophilicité versus hydrophobicité et avoir un LogD de 2, et ce sans pour autant avoir une bonne perméabilité. La tPSA de cette molécule sera toutefois bien au-delà de 140 angströms. La tPSA nous informe donc indirectement de la taille de la molécule, un des paramètres majeurs déterminant la perméabilité d'une molécule. Toutefois, la tPSA elle-même a certaines limitations. Plusieurs molécules macrocycliques par exemple ont la capacité d'exposer leur surface polaire dans un milieu hydrophile et de se replier de façon à camoufler ses dernières dans un environnement hydrophobe. Si on se contentait d'additionner la surface des différents groupements polaires de ce type de molécule, la tPSA très élevée obtenue suggérerait une faible perméabilité alors qu'on observe expérimentalement une bonne absorption de certains de ces composés. La tPSA ne nous informe donc pas sur la conformation tridimensionnelle de la molécule dans son solvant.⁵⁹ Le moyen optimal de tester la perméabilité d'une molécule est donc de le vérifier expérimentalement via une membrane artificielle (de type PAMPA par exemple) ou une

véritable lignée cellulaire (de type MDCK ou Caco-2). Ces essais demandent toutefois un équipement et une plus grande expertise.

Une autre propriété essentielle du profil pharmacocinétique d'une molécule est sa stabilité métabolique. En effet, un médicament avec une très bonne affinité peut s'avérer complètement inutile s'il est dégradé avant d'atteindre sa cible. Les médicaments administrés oralement par exemple doivent être stables dans un milieu acide et en présence d'enzymes afin de pouvoir éviter leur dégradation dans l'acide gastrique. L'existence de voies d'administration alternatives implique que ce ne sont pas tous les médicaments qui doivent être stables dans ce type de milieu. Toutefois, tous ceux voyageant dans le flux sanguin, soit la très grande majorité des médicaments, doivent l'être dans ce dernier. Dans le contexte d'un inhibiteur peptidique, le principal obstacle à cette stabilité est les protéases endogènes.⁶⁰ De façon plus générale, la stabilité d'un composé est d'autant plus importante que certains groupements fonctionnels peuvent être modifiés par des enzymes endogènes afin de générer de nouveaux groupements potentiellement toxiques, ou possédant d'autres activités biologiques que celle visée, pour le système.⁶¹ Dans cet ordre d'idées, sa capacité à se soustraire aux mécanismes d'excrétion endogènes est également un facteur à ne pas négliger.

Le médicament doit évidemment être exempt de toxicité afin d'en faire un candidat clinique valide.⁶² La toxicité se présente sous plusieurs formes, soit la toxicité aigüe causée par une administration importante ponctuelle, ou la toxicité chronique causée par une administration du traitement sur le long terme. La toxicité aigüe du médicament est d'abord testée indirectement sur des lignées cancéreuses. En effet, l'absence d'effet dose-réponse dans un essai de prolifération cellulaire peut suggérer qu'une dose létale a été atteinte. Elle pourrait suggérer que la molécule n'a pas de réel effet antiprolifératif, mais détruit simplement la membrane cellulaire à une certaine concentration, tuant la cellule via un mécanisme non spécifique. D'autres types d'essais *in vitro* existent afin d'identifier une toxicité potentielle, mais la méthode généralement utilisée pour identifier la présence de toxicité aigüe repose sur l'injection de doses importantes de composé à un modèle animal. Si le produit est bien toléré, les études cliniques préliminaires peuvent par la suite permettre d'identifier la présence d'effets toxiques chez l'humain.⁶²

Tous les paramètres identifiés précédemment sont essentiels à prendre à compte lors du développement d'un médicament. Obtenir une bonne performance dans chacun d'entre eux individuellement n'est généralement pas quelque chose de très complexe, la véritable difficulté de la chimie médicinale étant d'arriver à respecter chacune de ses contraintes tout en préservant une bonne affinité du médicament pour sa cible. Le profil pharmacocinétique d'une molécule est important, mais il ne faut pas perdre de vue qu'une liaison facile de la molécule au site actif reste une priorité.

I.3.4 Essais pharmacodynamiques

Afin d'évaluer l'affinité d'un inhibiteur pour sa cible, deux principaux essais biologiques ont été utilisés dans le cadre du présent projet. Ils seront introduits dans la section suivante afin de pouvoir apprécier le design rationnel de la relation structure-activité dont ils sont la base.

Au laboratoire, le premier test auquel est soumis un analogue purifié est généralement l'essai enzymatique. Dans cet essai, l'inhibiteur sera combiné à son enzyme cible (dans notre cas, la PACE4 recombinante) et à un substrat de cette dernière dans une solution tampon. La concentration d'inhibiteur dans chaque puits est variable tandis que les autres paramètres sont constants. La propension de l'inhibiteur à créer un complexe avec le ligand (K_{on}) et à demeurer sous cette conformation (K_{off}) corrèle avec sa capacité à bloquer la liaison du substrat à son site actif et ainsi empêcher le clivage.⁶³ La présence de substrat clivé est ensuite dosée par fluorimétrie, la quantité de substrat clivé étant logiquement inversement proportionnelle à l'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme. Les résultats sont ensuite interprétés dans un graphique semi-log afin de déterminer une valeur d' IC_{50} , soit une valeur représentant la concentration d'inhibiteur nécessaire afin de réduire l'activité enzymatique de moitié.⁶⁴ À partir de cette donnée est calculée la constante d'inhibition K_i dans une formule impliquant les valeurs $[S]$, soit la concentration (fixe) de substrat, et K_m , la quantité de su. Cette valeur de K_i est un indicateur de l'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme dans un contexte d'inhibition compétitive. Une faible valeur de K_i est donc associée à une plus faible quantité d'inhibiteur nécessaire pour le même effet, soit à un ligand plus efficace.

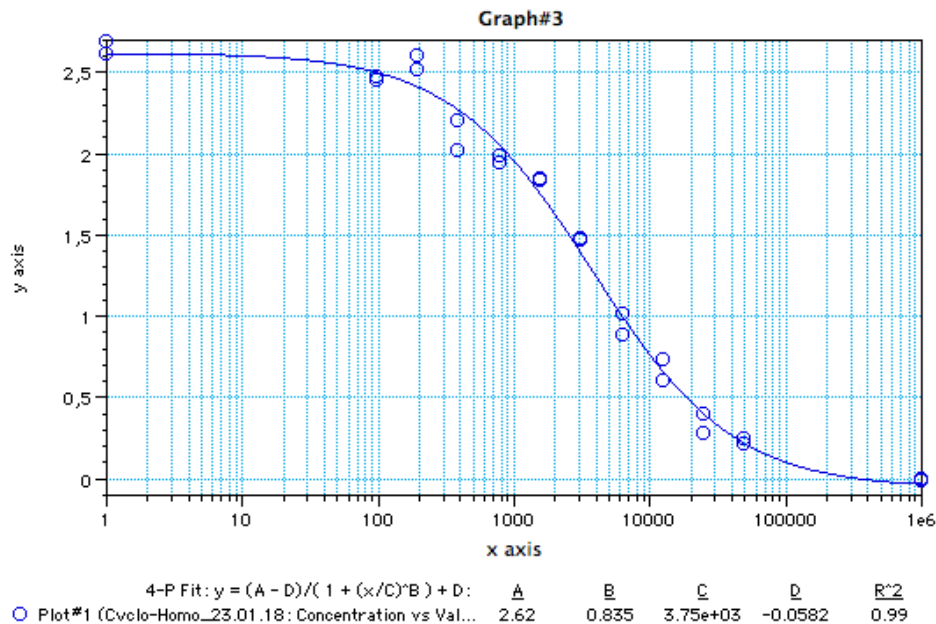
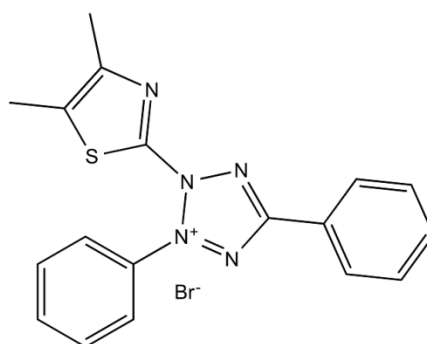
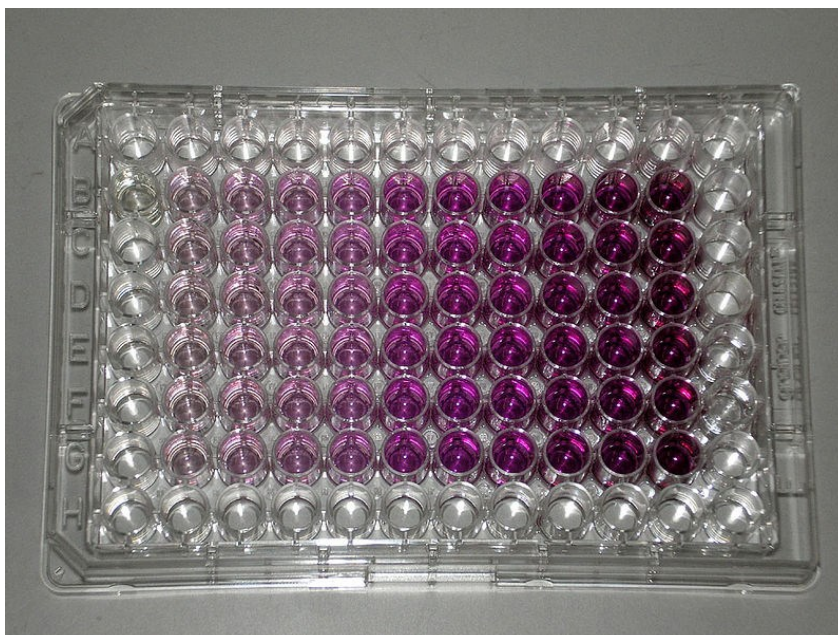


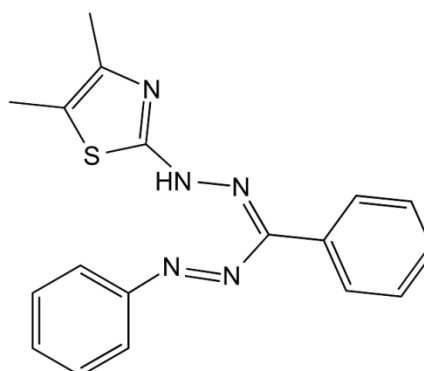
Figure 12. . Exemple de graphique obtenu par essai enzymatique permettant de déterminer une valeur de K_i

L'essai enzymatique nous permet de déterminer l'inhibition directe en contact avec sa cible, mais ne nous donne aucune information sur son comportement dans un système biologique. D'où l'importance d'autres essais telle le test MTT dans lequel des lignées cellulaires exprimant PACE4 –dans notre cas LNCaP et DU145, lignées cellulaires de cancer de la prostate– sont exposées à des concentrations croissantes d'inhibiteur. Les cellules vont croître durant une certaine période de temps, après laquelle ils seront testés au MTT (ou bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltétrazolium). Il s'agit d'un essai colorimétrique dans lequel les cellules vivantes vont réduire le MTT en un chromophore violet. En dosant le changement de couleur, il est possible de déterminer le niveau de prolifération cellulaire lié à chaque concentration (Figure 13).^{65,66} Ceci permet de tracer une courbe dose-réponse et de déterminer une valeur d' IC_{50} , soit la quantité de produit nécessaire afin de réduire la prolifération de cellules cancéreuses de moitié (Figure 12). Donc, tout comme dans l'essai enzymatique, un IC_{50} de plus faible valeur correspond à une plus faible quantité de composé afin d'atteindre le même effet antiprolifératif et est donc préférable à une grande valeur.



3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
(**MTT**)

Mitochondrial Reductase



(*E,Z*)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan
(**Formazan**)

Figure 13. Plaque d'essai MTT (haut) et molécules de MTT et de Formazan (bas)

I.3.5 Développement du C23

À la lumière des précédentes recherches sur la PACE4 et son implication dans le cancer de la prostate, d'autres travaux furent effectués afin de développer un inhibiteur peptidique spécifique à la PACE4. En se basant sur la séquence consensus de clivage des PCs, une série de peptides fut produite par chimie combinatoire. Le motif RVKR était conservé pour les acides aminés en position P4 à P1 (P1 correspondant à l'acide aminé C-terminal), mais différents acides aminés furent testés pour les positions subséquentes, soit de P5 à P8. À ce propos, noter que la position «P1» fait référence au premier résidu en aval du site de clivage de l'enzyme, la «P2» correspondant au résidu suivant et ainsi de suite. Le premier résidu en amont serait pour sa part nommé P1'. Les résultats démontrèrent une bonne affinité et spécificité pour la PACE4 (versus la furine, une PC de référence) avec le résidu Leu en P6. Il fut alors proposé de permuter l'entière séquence P5 à P8 par des résidus Leu, créant ainsi un inhibiteur peptidique de la PACE4 d'ordre nanomolaire ($K_i = 22,0 \pm 5,6$ nM) et ayant un ratio de sélectivité de 20 versus la furine. Cet inhibiteur fut nommé le Multi-Leu (Figure 14).³⁹

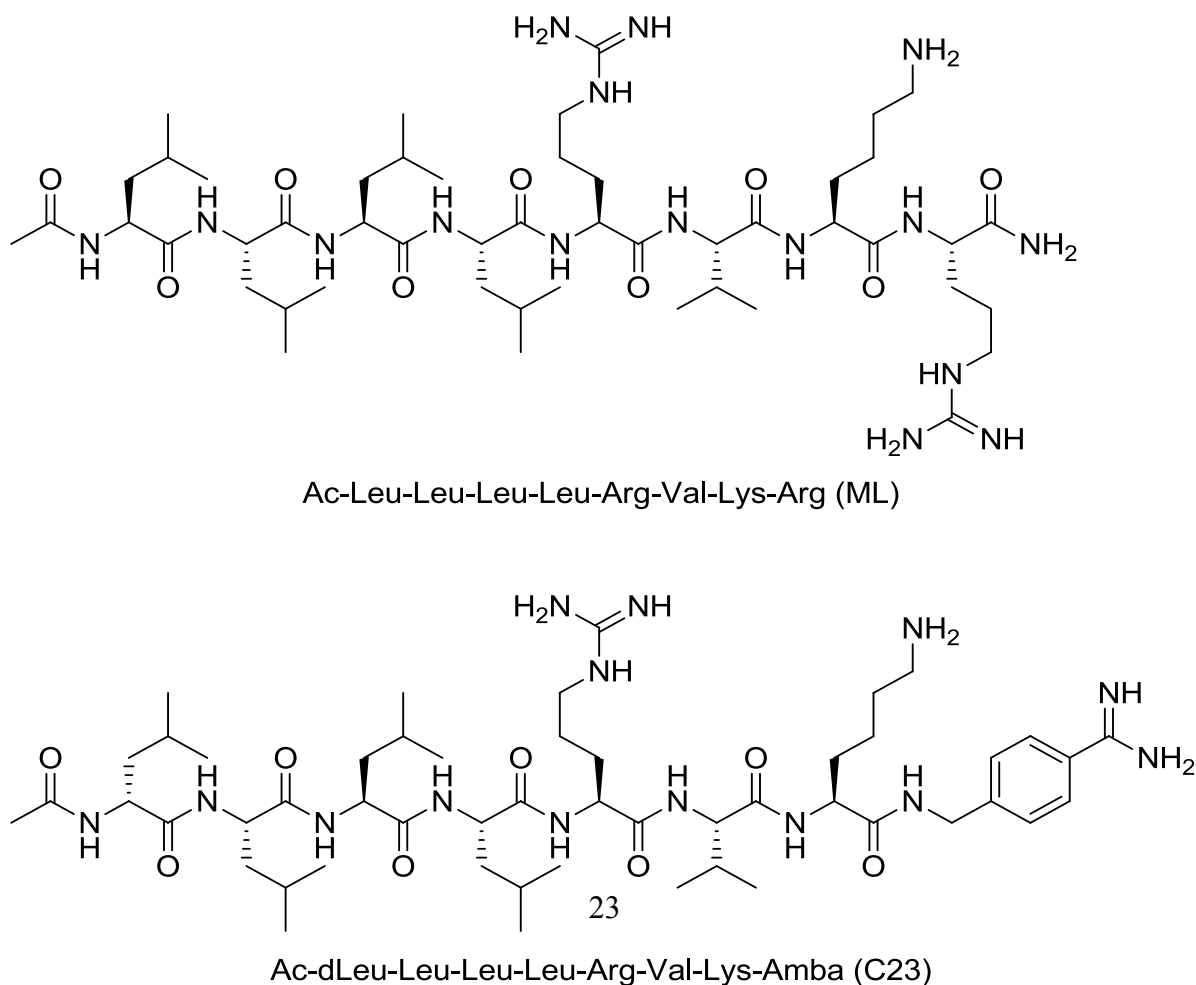


Figure 14. Inhibiteur de PACE4 Multi-Leu (ML) et C23

Le principal obstacle afin de faire du peptide Multi-Leu (ML) un véritable médicament anticancéreux était sa faible stabilité plasmatique, obstacle prévisible en fonction de sa structure peptidique. Afin d'augmenter cette stabilité, une approche peptidomimétique fut utilisée. Plusieurs analogues furent produits par modification de diverses sections du ML, notamment le C-terminal et le N-terminal. Le résultat de cette étude de relation structure-activité fut le C23, une version modifiée du ML. Le C23 a de différent une D-leucine au lieu d'une L-leucine en P8 au lieu et un groupement Amba (un arginomimétique) en P1 au lieu de l'arginine.^{67,68} Ce produit a une demi-vie de $1,56 \pm 0,11$ h versus $0,13 \pm 0,02$ h pour ML, une amélioration de stabilité d'un facteur 12. L'affinité du composé pour la PACE4 fut également légèrement améliorée par l'ajout de ses modifications, mais l'affinité pour la furine s'est vue augmentée également, le composé perdant par ce fait même une bonne partie de sa sélectivité (de 20 fois à 2 fois) (Tableau 2). Cette perte de sélectivité est regrettable, mais est probablement un mal nécessaire dans l'élaboration d'un candidat clinique, et ce pour certaines raisons décrites ci-contre.

Tableau 2. Comparaison des valeurs d'affinité enzymatique, d'activité antiproliférative et de stabilité métabolique de ML, C23 et dérivés

	K _i PACE4 (nM)	K _i Furine (nM)	IC50 DU145 (μM)	IC50 LNCaP (μM)	t _{1/2} (h)
C23 (DMLAmba)	4,9 ± 0,9	9,8 ± 2	25 ± 10	40 ± 10	1,56 ± 0,11
MLAmba	3,1 ± 0,8	4,3 ± 0,8	25 ± 10	40 ± 10	1,23 ± 0,08
DML	24 ± 1	760 ± 20	70 ± 30	150 ± 40	N.D.
ML	22 ± 6	430 ± 10	100 ± 10	180 ± 60	0,13 ± 0,02

Comme mentionné précédemment, les sept premières PCs ont un motif préférentiel de clivage, soit la séquence consensus R/K-X-X-R. Cette forte homologie constitue un obstacle important à la synthèse d'un inhibiteur sélectif et comme seule PACE4 est essentielle à la prolifération tumorale, l'inhibition d'autres PCs n'aurait non seulement aucun bénéfice, mais pourrait entraîner divers effets adverses. Les effets de cette perte de sélectivité sont parfois considérés comme secondaires si elle est accompagnée d'une forte hausse de spécificité pour la cible. Considérant que l'inhibiteur de PACE4 sera administré à des patients ayant une condition médicale sérieuse, voire mortelle, il est raisonnable d'accorder une importance capitale à d'autres paramètres, la sélectivité pour PACE4 étant un enjeu sérieux, sans être toutefois centrale dans l'élaboration d'un candidat clinique.

Malgré le gain substantiel de stabilité de C23 par rapport à ML, la stabilité de C23 s'avère toujours être le paramètre limitant afin d'en faire un véritable candidat clinique. L'objectif de nos recherches était donc de poursuivre les études de structure-activité afin d'identifier de nouvelles modifications pouvant être apportées qui permettraient à notre inhibiteur d'atteindre un profil pharmacocinétique appréciable, tout en préservant une forte affinité pour la PACE4. Nous avons d'abord cherché à optimiser la stabilité par études de relation structure-activité, principalement via des modifications bioisostériques mais également via macrocyclisation. Ce travail d'optimisation de la stabilité est détaillé dans le chapitre 1. Ces résultats ont suggéré fortement que la perméabilité de nos inhibiteurs peptidiques était probablement responsable d'une perte importante d'efficacité *in cellulo*. Nous avons donc cherché à élucider cette question, tout d'abord en essayant d'adapter un essai de perméabilité connu et utilisable à haut débit, l'essai PAMPA, afin de pouvoir estimer rapidement la perméabilité de nos nouveaux inhibiteurs. Cette tentative n'ayant pas été couronnée de succès, nous nous sommes tournées vers un essai de cytométrie de flux (FACS) afin de répondre aux questionnements issus des travaux du premier chapitre. Ce travail sur la perméabilité des inhibiteurs inspirés de Multi-Leu sont décrits dans le chapitre 2.

CHAPITRE 1 : OPTIMISATION DE LA STABILITÉ

1.1. Introduction

La stabilité est l'une des principales contraintes auxquelles est soumis un nouveau traitement pharmacologique et est reconnue comme étant le point faible des médicaments peptidiques. Notre tête de série, le C23, a une stabilité substantielle pour un peptide ($t_{1/2}$ plasmatique = 1.56 ± 0.11 h), mais nous croyons qu'elle pourrait être bonifiée davantage via des modifications stratégiques. L'objectif que nous nous sommes donné est donc d'améliorer au maximum la stabilité de notre tête de série tout en préservant d'autres paramètres pharmacocinétiques, telles sa solubilité, sa perméabilité et sa toxicité, n'ayant pas posé problème lors de nos essais de prolifération cellulaire.

Le principal obstacle à la stabilité d'un inhibiteur peptidique est les peptidases endogènes. Elles sont réparties en deux catégories : les endopeptidases et les exopeptidases. Ces dernières vont dégrader le lien amide reliant les acides aminés des extrémités au reste du peptide tandis que les endopeptidases vont cliver au sein même du peptide. D'ordre général, les peptidases ont toutes une séquence préférentielle qu'elles vont cibler. La trypsine est un exemple d'endopeptidase dont le site de clivage est en C-terminal des acides aminés basiques, telles l'arginine et la lysine.⁶⁹

1.2. Approche bioisostérique

Il a été question de bioisostères précédemment lors de la description des études de structure-activité. Il s'agit de groupements fonctionnels pouvant se substituer à d'autres ayant des propriétés physicochimiques (pKa, hydrophobicité, etc.) similaires, généralement dans l'optique d'améliorer le profil pharmacocinétique d'une molécule sans influencer négativement son affinité.

La puissance de l'approche bioisostérique peut être illustrée dans cet exemple tiré des travaux du groupe d'Yves Dory. La molécule à l'étude dans cet exemple est un agoniste peptidomimétique de récepteur opioïde qui, comme C23, souffre d'une stabilité insuffisante ($t_{1/2}$ plasmatique = 1.8 min). Par

approche isostérique, plusieurs analogues de ce peptide ont été synthétisés. En modifiant le carboxylate en C-terminal par un tétrazole fut obtenu un analogue portant également une charge négative à pH physiologique, cet analogue n'offrant toutefois aucun gain au niveau de l'affinité ou de la stabilité du produit. Nous aurions pu présumer obtenir une résistance accrue aux exopeptidases, mais cette dernière ne fut pas observée. Ceci étant dit, il serait hâtif d'écarter l'option des exopeptidases, certaines d'entre elles pouvant cibler préférentiellement le côté N-terminal du produit. En modifiant l'amine en N-terminal par une guanidine, un analogue presque neuf fois plus stable fut obtenu, corroborant cette théorie. La combinaison des modifications C et N-terminales, pouvant sembler à la base contre-intuitive considérant que le tétrazole en C-terminal n'a démontré aucun bénéfice, permet d'observer une hausse énorme de stabilité, soit de 1,8 min à 6 h (Figure 15).⁷⁰ Suite aux résultats obtenus, nous serions en mesure de présumer que le C-terminal était effectivement une cible secondaire des exoprotéases par rapport au N-terminal et que sa protection était bel et bien effective, mais inutile dans un contexte où une cible N-terminale privilégiée était sans protection. Indépendamment du mécanisme exact derrière cet effet synergique, l'exemple avait comme objectif d'illustrer d'une part le fort effet synergique de

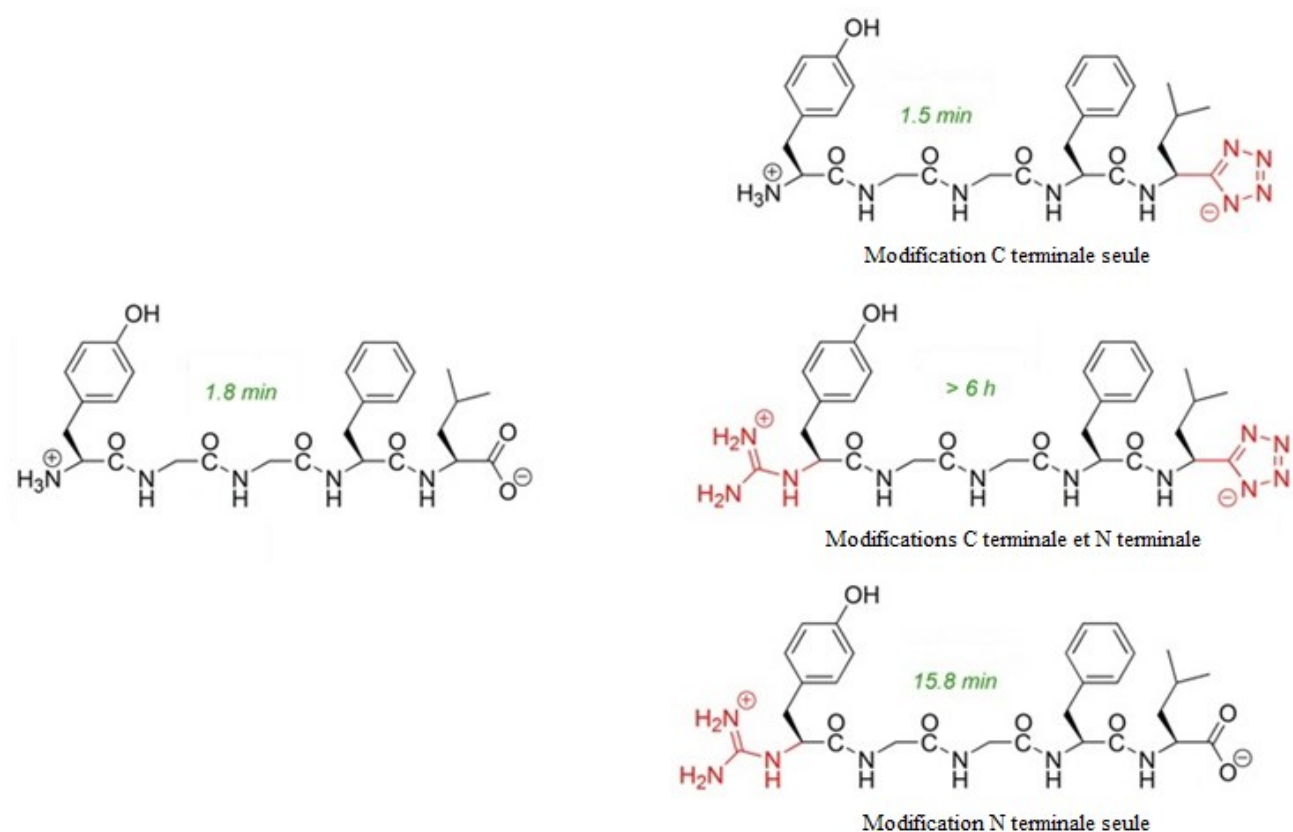


Figure 15. Analogues bioisostériques d'un agoniste delta opioïde avec stabilité plasmatique

certaines modifications et d'autre part la puissance de l'approche bioisostérique comme façon d'augmenter la stabilité d'un médicament peptidique.

1.2.1. Modifications en C-terminal

La section C-terminale d'un peptide est une cible de choix pour les exopeptidases. La modification Amba est déjà présente sur le C23 comparativement au ML (possédant à cette position une arginine) et lui confère une certaine protection. L'Amba est dans ce contexte un arginomimétique, soit une molécule dont le rôle est de mimer les interactions de l'arginine dans le site actif. L'Amba est la modification responsable d'une bonne partie des gains de stabilité de C23 par rapport à ML, mais il s'agit également de la modification qui est responsable de la perte presque entière de spécificité de l'inhibiteur par rapport aux autres PCs. L'observation du modèle par homologie de PACE4 semble suggérer une cavité plus étroite au site de liaison avec la P1 du peptide comparativement à la furine.⁷¹ Cette observation, si elle est exacte chez la véritable enzyme, expliquerait la perte de spécificité observée puisque l'Amba est un groupement plus large et moins flexible que la chaîne latérale de l'arginine. Nous avons donc investigué la position P1 un peu plus en profondeur afin de vérifier si d'autres modifications pourraient être préférables.

Les analogues produits possèdent une agmatine, soit essentiellement une arginine décarboxylée, en P1 au lieu d'Amba. Considérant que la synthèse peptidique type implique la liaison du peptide par son extrémité C-terminale et que l'analogue en question ne présente pas ce carboxyle, une stratégie de synthèse différente a été adoptée afin d'obtenir le produit désiré. En premier lieu, le 1,4-diaminobutane a été couplé à la résine 2-CTC puis, après clivage du peptide de la résine au HFIP, a été soumis à une réaction de guanidination par le 1H-pyrazole-1-carboxamidine HCl (Schéma 1). L'utilisation d'une résine facilement clivable était nécessaire afin de conserver les protections sur les chaînes latérales basiques lors de la réaction de guanidination pour éviter toute formation de produits secondaires potentiels.

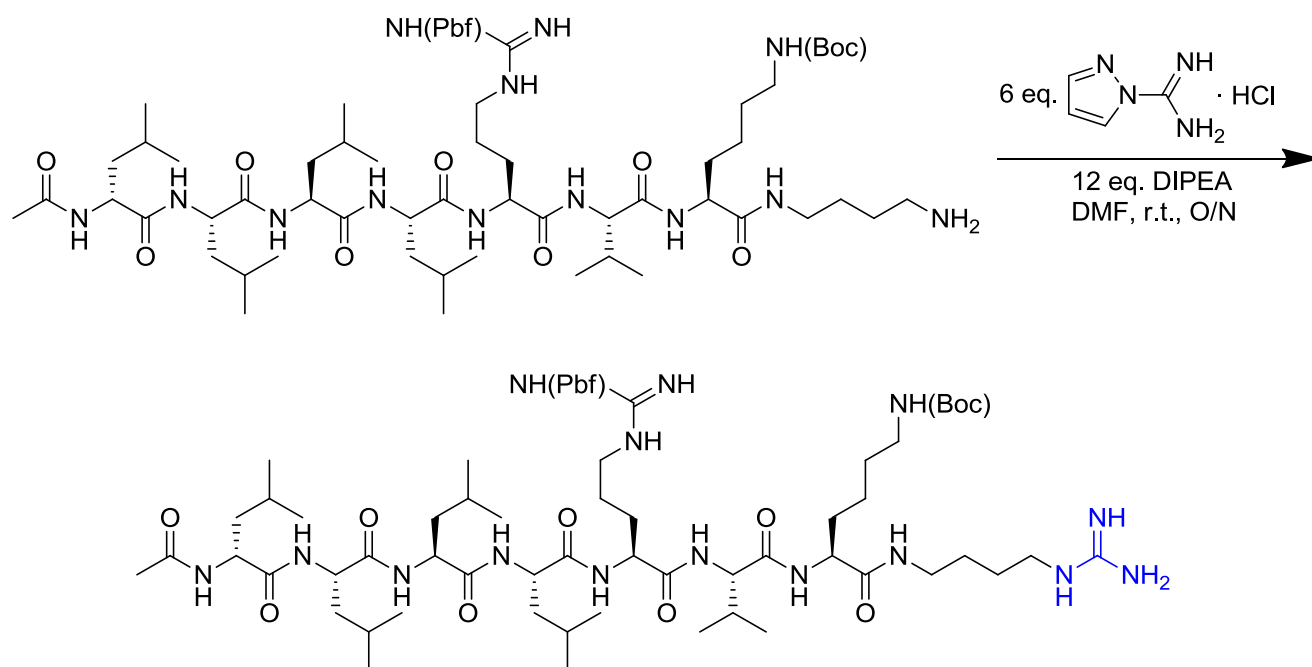


Schéma 1. Guanidination de l'amine secondaire en C-terminal pour obtenir l'analogue DMLAgm

Deux analogues furent synthétisés selon ce canevas, l'un avec une L-leucine en P8 et l'autre avec D-leucine. Les résultats biologiques obtenus pour l'un comme l'autre des analogues sont plutôt encourageants, avec une valeur d'IC₅₀ plus grande que C23, mais dans une échelle de grandeur comparable ($60 \pm 1 \mu\text{M}$ pour MLAgm et $70 \pm 30 \mu\text{M}$ pour DML-Agm versus $25 \pm 10 \mu\text{M}$ pour C23) (Tableau 3). Prendre note que la différence de trois ordres de grandeur entre l'essai enzymatique et l'essai de prolifération cellulaire est typique chez toutes nos séries de composés. Cette différence est toutefois considérable et pourrait être expliquée notamment par un problème de perméabilité cellulaire, dont il est question dans le Chapitre 2 de ce mémoire. Les analogues furent donc testés dans des essais de stabilité plasmatique, où leur dégradation dans le plasma sur un certain laps de temps fut dosée par UPLC-MS. Les résultats de stabilité obtenus furent toutefois beaucoup plus faibles que C23 ($0,32 \pm 0,05 \text{ h}$ pour MLAgm et $0,57 \pm 0,04 \text{ h}$ pour DML-Agm versus $1,56 \pm 0,11 \text{ h}$ pour C23) (Tableau 3).

Tableau 3. Comparaison des valeurs d'affinité enzymatique, d'activité antiproliférative et de stabilité métabolique des analogues modifiés en P1 avec C23

	K_i (nM)	IC₅₀ DU145 (μM)	IC₅₀ LNCaP (μM)	t_{1/2} (h)
DML-Agm	23,6 ± 2,4	70 ± 30	60 ± 2	0,57 ± 0,04
MLAgm	9,2 ± 0,4	60 ± 1	90 ± 5	0,32 ± 0,10
C23	4,9 ± 0,9	25 ± 10	40 ± 10	1,56 ± 0,11

Ces résultats de stabilité suggèrent que la présence ou l'absence de carboxyle a une incidence minimale sur la stabilité comparée à la présence d'Amba. Même si une augmentation de stabilité d'un facteur 2 a été observée chez MLAGm comparé à son analogue possédant un carboxyle en P1 ($t_{1/2}$ ML = $0,13 \pm 0,02$ h / $t_{1/2}$ MLAGm = $0,32 \pm 0,10$), cette augmentation est minimale comparé à l'augmentation d'un facteur de près de 10 observé entre le ML avec l'Amba ($t_{1/2}$ = $1,25 \pm 0,08$ h) comparé au ML normal ($t_{1/2}$ = $0,13 \pm 0,02$). Si la spécificité du composé pour PACE4 versus les autres PCs devient un enjeu majeur, par exemple car l'inhibition de la furine est associée à une trop forte toxicité ou des effets secondaires majeurs, la position P1 est probablement celle qu'il faudra modifier considérant les pertes significatives de spécificité associées à l'usage d'Amba. Si des changements doivent effectivement être apportés, des modifications comportant une chaîne alkyle d'un carbone de plus ou de moins que l'agmatine, telles que le 1-(3-aminopropyl)guanidine ou le 1-(5-aminopentyl)guanidine, pourraient être envisagées. Il est possible que l'agmatine, malgré sa plus grande flexibilité, ne soit pas à même d'aller effectuer le pont H au niveau du site actif aussi bien que l'arginine ou l'Amba et que ce genre d'ajustement de précision permette d'aller chercher une affinité équivalente (Figure 16). On pourrait également essayer de permuter l'Amba utilisé, soit le 4-aminométhylbenzamidine, par une 3-aminométhylbenzamidine, question de voir si le positionnement de la charge positive dans le site actif pourrait être amélioré. Toutefois, ce genre de modifications comportant un noyau aromatique ou autre groupement volumineux, bien qu'elles puissent améliorer certains paramètres, n'offrirait sûrement pas ou peu de gains niveau spécificité si la théorie du site actif étroit est bel et bien valide. Peu importe la modification utilisée, des pertes en termes de stabilité sont probables, pertes qui devraient le cas échéant être compensées via d'autres modifications à d'autres positions du peptide.

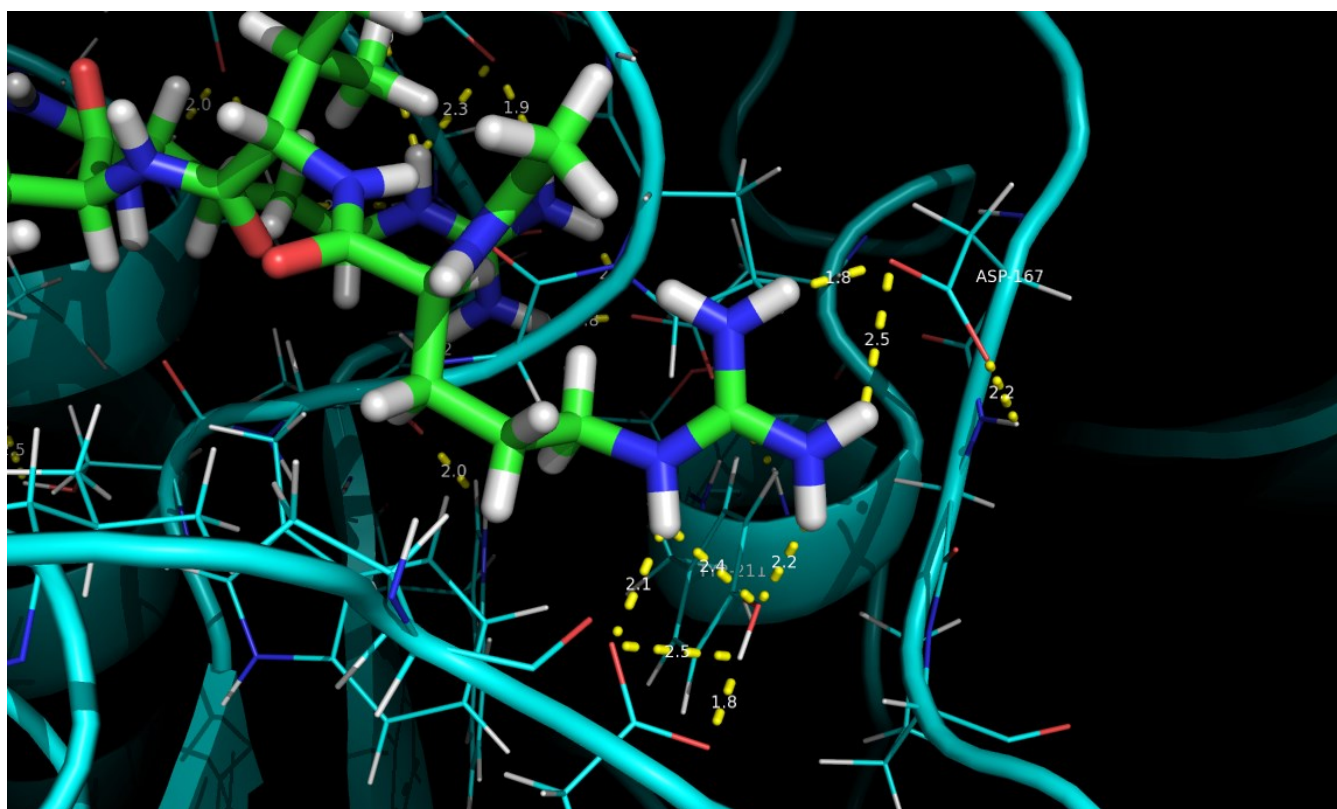
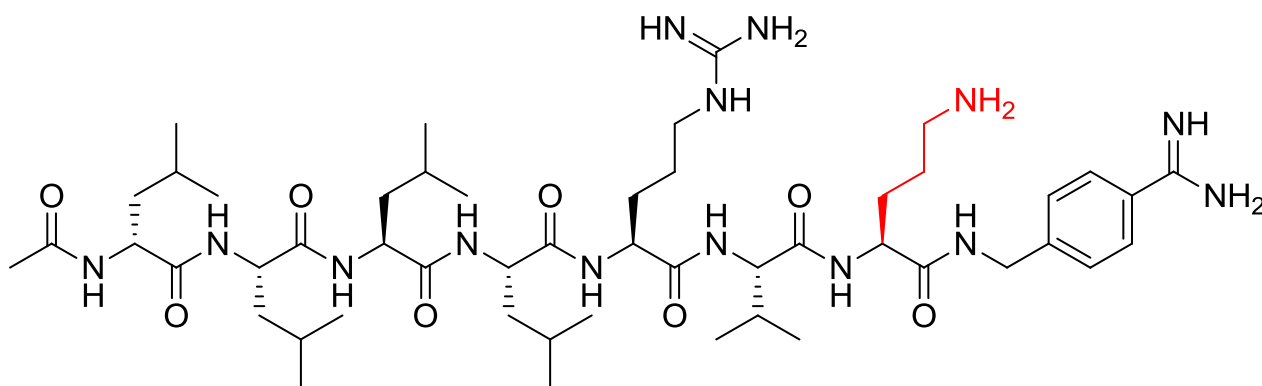


Figure 16. Peptide RVKR docké dans le site actif de PACE4. L'arginine en P1 effectue trois contacts polaires au niveau de D167, Y211 et E139. (Modèle par homologie de Manuel E. Than)

1.2.2. Modifications en P2

La séquence consensus des sept premières PCs favorise de façon importante la présence d'acides aminés basiques en position P2, suggérant une interaction importante dans le site actif. Il s'agit donc d'une position dont la modification pourrait théoriquement entraîner d'importantes pertes d'affinité. Dans cette optique, l'analogue tenté à cette position est très conservateur et n'intègre pas de fonction différente. Sa synthèse s'effectue par la permutation de la lysine en P2 par une ornithine en P2, une molécule essentiellement identique à la lysine, mais dont la chaîne latérale comporte un carbone de moins (Figure 17). L'amine primaire au bout de la chaîne se voit donc être rapprochée du cœur de la molécule, ce qui peut théoriquement raffiner l'angle et la force de liaison dans le site actif. La synthèse de cet analogue a été faite par SPPS standard, à l'exception que la Fmoc-Ornithine(Boc)-OH fut chargée sur la résine au lieu de la Fmoc-Lysine(Boc)-OH. Par contre, la purification du produit fut plus difficile que celle de C23. En effet, un épaulement avait tendance à apparaître juste derrière le pic majoritaire après l'ajout d'Amba. Nous sommes toutefois parvenus à obtenir un produit à plus de 95% de pureté en augmentant le temps d'analyse et en utilisant un pourcentage d'acétonitrile de départ et de fin plus près du pourcentage d'élution du peptide. Notre hypothèse est l'épimérisation plus facile de l'ornithine par rapport à la lysine dans le milieu réactionnel de la réaction de couplage avec l'Amba, une considération plus ou moins pertinente à cette étape du développement, mais pouvant le devenir si ce type d'analogue est choisi et doit être produit à grande échelle. La dernière étape de synthèse, soit l'ajout d'Amba en phase liquide, correspond à du «segment coupling», une étape reconnu pour favoriser l'épimérisation.⁷²



Ac-dLeu-Leu-Leu-Leu-Arg-Val-Orn-Amba (DOrnAmba ML)

Figure 17. Analogue DOrnAmba ML, modifié en position P2

Malgré ces complications, le produit fut purifié et testé. Les valeurs de K_i obtenues en essai enzymatique sont de $5,37 \pm 0,06$ nM pour DOrnAmba ML (analogue avec D-leucine en P8) et $1,65 \pm 0,02$ nM pour OrnAmba ML (analogue avec L-leucine en P8), ce qui est équivalent aux valeurs de C23, suggérant que la liaison au site actif ne s'est pas vue modifiée par le retrait d'un carbone de la chaîne latérale de la lysine. Toutefois, en essai MTT, les valeurs obtenues sont de 85 ± 10 μ M et 93 ± 15 μ M pour DOrnAmba ML et OrnAmba ML respectivement pour la lignée DU145 et de 190 ± 30 μ M et 230 ± 10 μ M chez la lignée LNCaP (Figure 18). Ces valeurs d' IC_{50} sont significativement plus élevées que celles de C23. Afin de rationaliser cette absence de corrélation entre les valeurs enzymatiques et cellulaires, deux hypothèses semblent plausibles. L'une d'entre elles est que le produit ayant une valeur de K_i plus faible ait bel et bien une constante d'association plus élevée et de dissociation moins élevée avec l'enzyme, mais que sa perméabilité cellulaire soit inférieure à celle de l'autre analogue. Une seconde hypothèse serait celle selon laquelle le produit ayant une valeur de K_i plus faible a une stabilité considérablement inférieure à l'autre analogue dans le milieu de culture et qu'une dégradation hâtive par rapport à ce dernier soit responsable de l'activité inférieure en cellule. Il faut toutefois garder à l'esprit qu'à ce point dans le projet, la quantité de données à notre disposition ne nous permet pas de jauger adéquatement de la valeur réelle de ces hypothèses. Malgré des valeurs en essai MTT indiquant une perte importante d'activité antiproliférative, les analogues furent testés en essai de stabilité plasmatique. Les valeurs obtenues furent de 4,16 h pour DOrnAgm et de 1,03 h pour OrnAgm. La stabilité de 4,16 h est un résultat relativement encourageant, mais la perte d'activité cellulaire associée est regrettable et nous avons orienté nos recherches sur d'autres analogues. Puisque la stabilité des analogues ornithine ne semble pas être fortement diminuée par rapport à la tête de série, nous avons présumé que le retrait d'un carbone de la chaîne latérale était responsable d'une perte de LogP chez cet analogue, et donc de perméabilité, d'où les valeurs d' IC_{50} plus élevées.

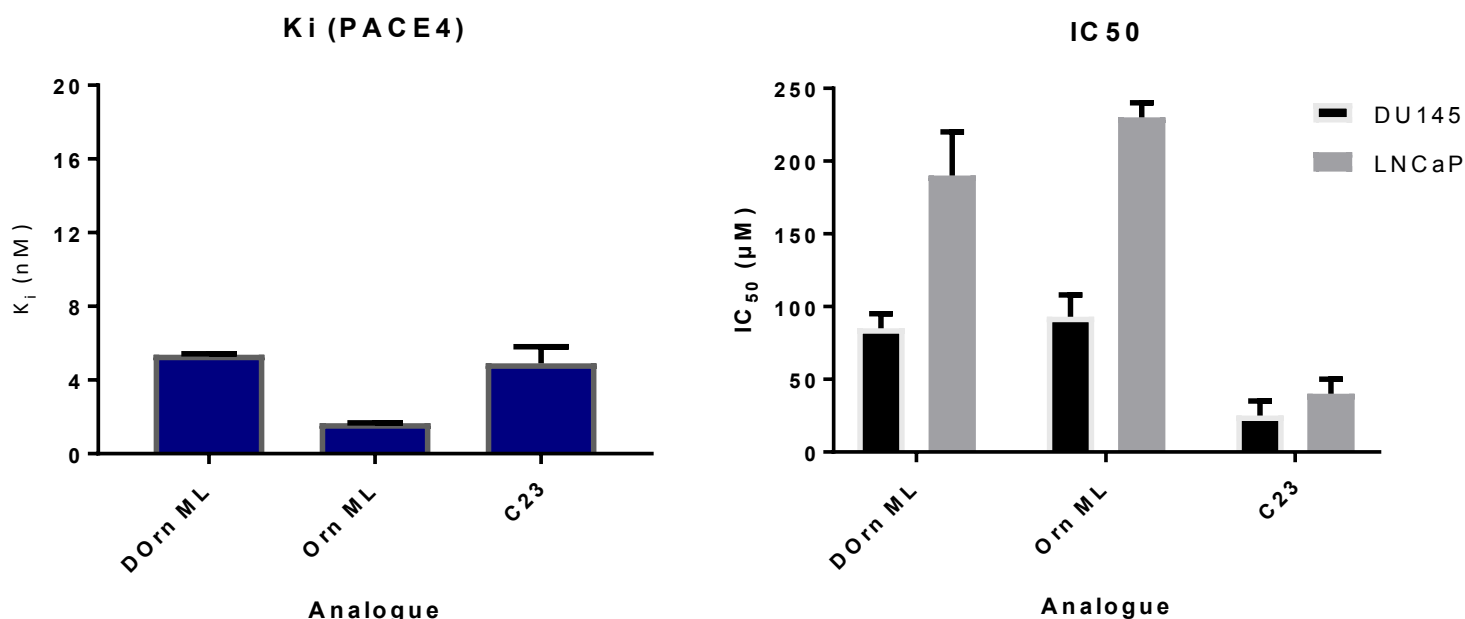


Figure 18. Histogramme comparatif des valeurs enzymatiques de certains analogues du scan en position P5 à P8

1.2.3. Modifications en P3

Contrairement à la position P1 et P2, la position P3 étant naturellement occupée par un résidu hydrophobe, n'est pas impliquée dans une interaction électrostatique au site actif de l'enzyme. La présence d'un acide aminé basique tel l'arginine ou la lysine n'est pas nécessaire afin d'avoir une affinité appréciable pour la cible. L'acide aminé en P3 est donc au cœur du site actif sans toutefois être impliqué dans des interactions polaires avec l'enzyme, faisant de cette position une excellente cible de modification. Cette cible a été amplement étudiée par les travaux de Dianati *et al.* qui ont produit plusieurs analogues aux valeurs de K_i plus faibles et surtout plus spécifiques pour la PACE4 que C23 en exploitant une interaction supplémentaire ne se retrouvant pas chez la furine.⁷³ Cette interaction avec l'aspartate 160 de la PACE4 est toutefois conditionnelle à la présence d'un coude bêta induit par un résidu ayant un embranchement bêta, d'où la conservation d'un méthyle en bêta du carbone alpha du résidu en P3 (Figure 20). La valine normalement retrouvée à cette position présente naturellement cet embranchement bêta et une structure similaire a été conservée chez les analogues proposés, mais en ajoutant une amine ou guanidine à différentes distances dans la chaîne latérale afin d'exploiter une interaction électrostatique (Figure 19). Ces résultats, bien que présentant des valeurs de K_i faibles,

présentent toutefois un problème majeur, soit une activité en cellule presque nulle. Ceci suggère probablement une perte de perméabilité associée à la hausse de polarité en P3. Nous avons donc poursuivi le design rationnel à partir de ce point en s'efforçant de ne pas ajouter de polarité supplémentaire en P3 chez nos analogues.

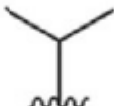
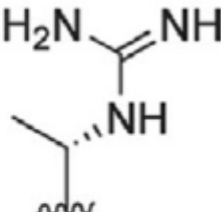
		
Side chain:		
Xaa:	Val	S- <i>i</i> -Agb
PACE4 K_i (nM):	22±6	2.7±0.7
Furin K_i (nM):	430±10	110±4
Selectivity:	20	40

Figure 19. Comparaison des valeurs enzymatiques de ML versus un analogue modifié en P3

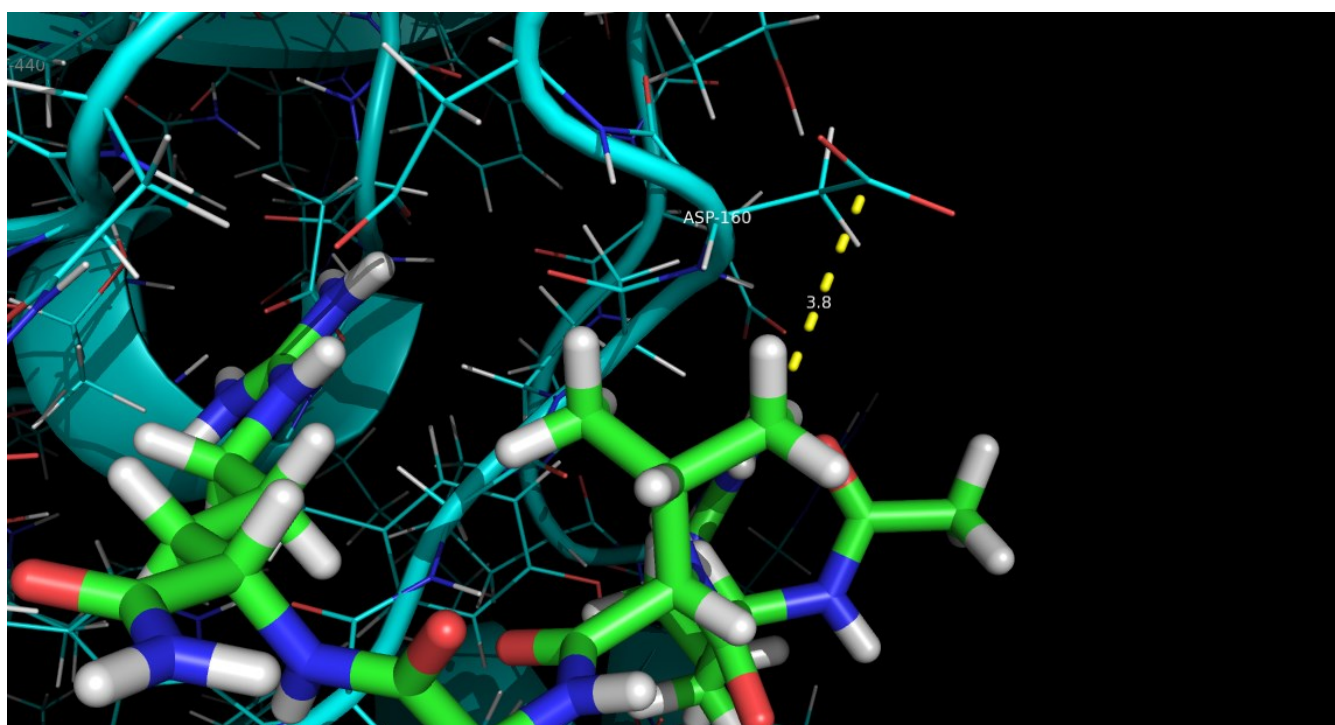
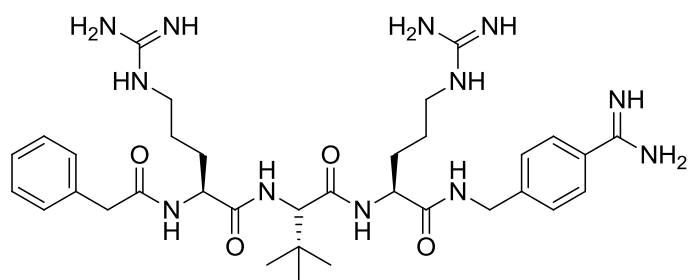


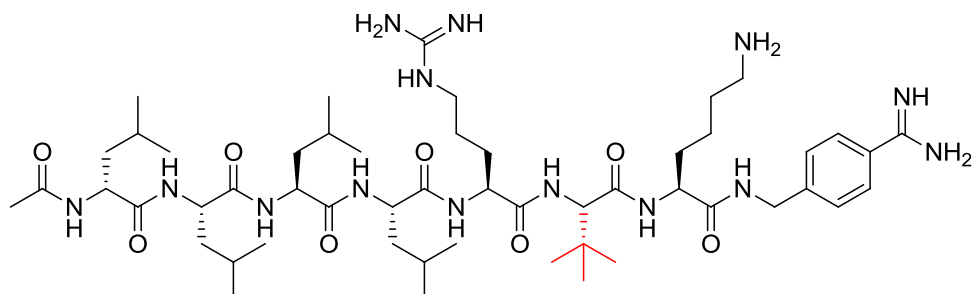
Figure 20. Peptide RVKR docké dans le site actif de PACE4. L'objectif des travaux de Dianati *et al.* est d'exploiter l'interaction électrostatique possible entre l'aspartate 160 et le résidu en P3 de Multi-Leu. (Modèle par homologie de Manuel E. Than)

Trois séries d'analogues ont donc été produites (Figure 21). L'une d'entre elles est inspirée par le MI-1148 d'un groupe de recherche se spécialisant dans les inhibiteurs de furine.⁷⁴ Nous avons cherché à vérifier si les gains de stabilité associés à la modification de la valine pour la *tert*-leucine pouvaient être reproduits chez C23. Comme pour la majorité de nos analogues, nous avons synthétisé une version avec la modification D-leucine en P8 et l'autre sans. La seconde série voit sa valine permutée par un acide 1-aminocyclopentanoïque (cycloleucine) ou un acide 1-aminocyclohexanoïque (homocycloleucine). Cette série, testée uniquement en version D-Leu en P8, avait pour objectif de vérifier si l'ajout de davantage d'hydrophobicité à cette position pouvait améliorer encore plus la stabilité du composé. La troisième et dernière série d'analogues testée est basée sur la modification de la valine en P3 par une N-méthyl-valine. Puisque l'hydrophilicité additionnelle chez les analogues de C23 semble être responsable d'une perte d'activité en cellule, nous avons essayé d'aller à l'inverse en ajoutant un méthyle de plus afin de vérifier si ceci pouvait aider à la translation des résultats enzymatiques au niveau cellulaire. De plus, la N-méthylation de la valine induit encore plus fortement le coude bêta observé chez les analogues de Dianati et qui est responsable de la haute affinité et sélectivité du composé.⁷⁵ Malgré l'impossibilité d'obtenir le pont salin observé chez ses analogues, nous cherchions à obtenir une orientation préférentielle de la chaîne latérale en P3 de façon à acquérir une partie des bénéfices de ses analogues, mais sans les effets négatifs.

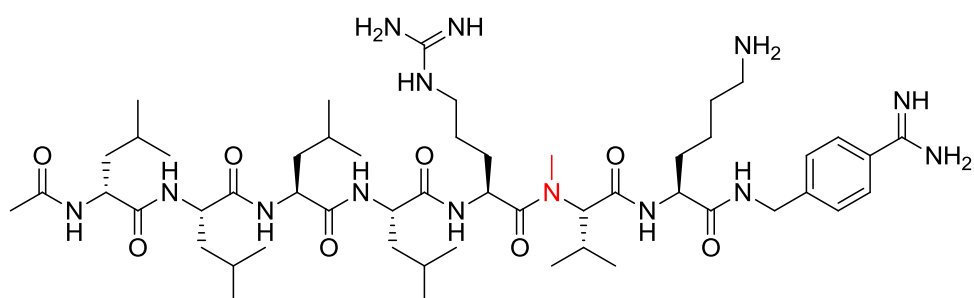
La synthèse des analogues avec une *tert*-leucine, cycloleucine ou homocycloleucine en P3 s'est faite par SPPS standard de la même façon que C23, à l'exception de l'acide aminé à coupler en P3. Pour ce qui est de l'analogue avec la N-méthyl-valine, le couplage de cette dernière est effectué selon les protocoles de couplage standard. Toutefois, l'amine secondaire obtenue par déprotection de Fmoc est plus encombrée et beaucoup moins réactive que l'amine primaire généralement présente à cette étape. Il a donc été nécessaire d'utiliser des agents de couplage alternatifs afin de coupler l'arginine en P4. Le reste de synthèse s'est fait selon notre protocole de synthèse de C23 décrit en Annexe 1.



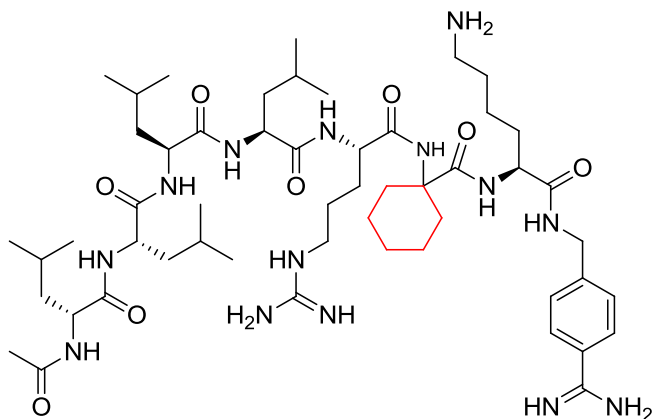
[4-(guanidinométhyl)phenylacétyl]-Arg-tertLeu-Arg-Amba (MI-1148)



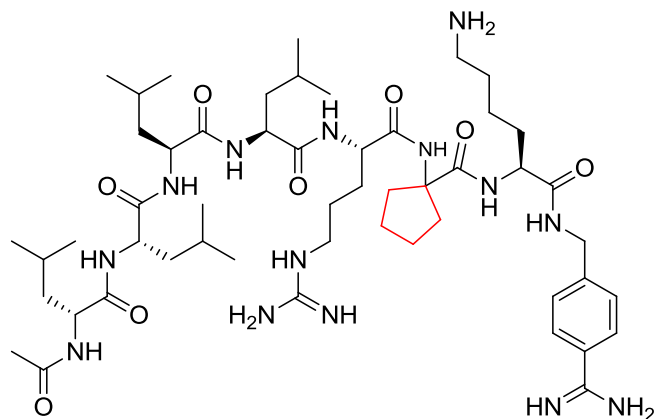
Ac-dLeu-Leu-Leu-Leu-Arg-tertLeu-Lys-Amba (DTIe ML)



Ac-dLeu-Leu-Leu-Leu-Arg-NMeVal-Lys-Amba (DNMeVal ML)



Ac-dLeu-Leu-Leu-Leu-Arg-HomoCycloLeu-Lys-Amba
(HomoCyclo ML)



Ac-dLeu-Leu-Leu-Leu-Arg-CycloLeu-Lys-Amba
(CycloLeu ML)

Figure 21. Structures de MI-1148 et analogues de C23 modifiés en position P3

Les résultats de l'analogue avec la *tert*-leucine (analogues Tle ML et DTle ML) s'avérèrent supérieurs à ceux modifiés avec la N-méthyl-valine. Les valeurs de K_i de l'ordre de celles de C23, voire inférieures (K_i Tle ML = $0,36 \pm 0,07$ nM / K_i DTle ML = $3,59 \pm 1,51$ nM) et les valeurs d' IC_{50} chez la lignée DU145 sont également dans le même ordre, quoique légèrement supérieures (IC_{50} Tle ML = 70 ± 20 μ M / IC_{50} DTle ML = 40 ± 10 μ M) (Figure 22). Considérant ces résultats préliminaires positifs, nous avons poursuivi les essais de stabilité avec l'analogue DTle ML, obtenant une valeur de demi-vie de $8,1 \pm 2,1$ h, soit un résultat encourageant.

Les analogues ayant la cycloleucine ou homocycloleucine (CycloLeu ML et HomoCyclo ML respectivement), ont présenté de bien piètres résultats enzymatiques et cellulaires et ne furent pas testés en stabilité, leurs valeurs de K_i étant jugées trop élevée pour que l'un ou l'autre des composés puisse de façon réaliste remplacer C23 comme tête de série. S'il y a quelque chose à tirer de ces résultats, c'est que la valeur de K_i de $305,3 \pm 107,5$ μ M pour CycloLeu ML est considérablement plus élevée que celle d'HomoCycloLeu ML de $130,5 \pm 21,1$ μ M, suggérant que la perte de l'inhibition ne peut être seulement imputable à la taille de la chaîne latérale P3.

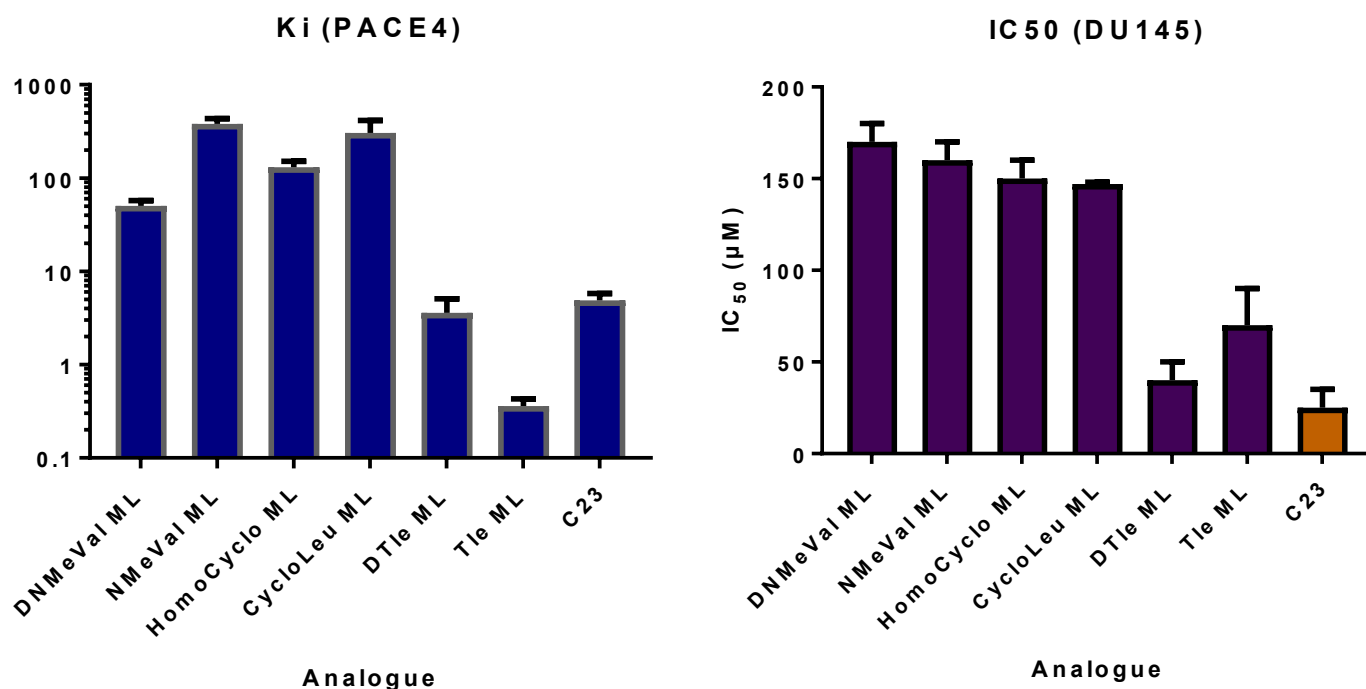


Figure 22. Valeurs d'inhibition enzymatique et d'activité antiproliférative des analogues modifiés en position P3

La série d'analogues comportant la N-méthyl-valine (nommées NMeVal ML et DNMeVal ML) a obtenu des valeurs de K_i plutôt élevées, tout particulièrement chez l'analogue sans la D-leucine (K_i NMeVal ML = $381,7 \pm 52,7$ nM / K_i DLNMeVal ML = $50,4 \pm 7,1$ nM). On explique mal cette forte disparité entre les valeurs enzymatiques. Des différences importantes au niveau de la stabilité ont été observées chez des analogues ayant D-Leu en P8 versus d'autres avec L-Leu P8, mais très rarement au niveau de l'affinité enzymatique. Une explication probable serait qu'un coude bêta induit par la N-méthyl-valine oriente le peptide dans une certaine conformation dans laquelle la D-leucine favorise une certaine interaction avec la cible. Le point reste que la position P8 du peptide n'est pas censée être impliquée dans la liaison au site actif et le fait que sa modification soit responsable d'un tel changement d'affinité est étrange. Cette variation importante n'est toutefois pas observée dans l'essai cellulaire où la valeur d' IC_{50} des analogues NMeVal ML et DNMeVal ML sont de 160 ± 10 μ M et 170 ± 10 μ M chez la lignée cellulaire DU145. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la perméabilité de la molécule au sein de la cellule soit un facteur limitant de l'essai. Les valeurs relativement élevées d' IC_{50} ne sont pas exactement dans le standard voulu, mais des essais de stabilité ont tout de même été effectués chez l'analogue le plus propice en vue d'obtenir de bons résultats, soit celui modifié avec la D-Leu en P8. Les résultats de stabilités obtenus furent excellents, avec une valeur de temps de demi-vie de $8,9 \pm 0,2$ h, une valeur 5,7 fois supérieure à C23. Cette excellente stabilité reste toutefois éclipsée par la faible efficacité en essai cellulaire (Figure 23).

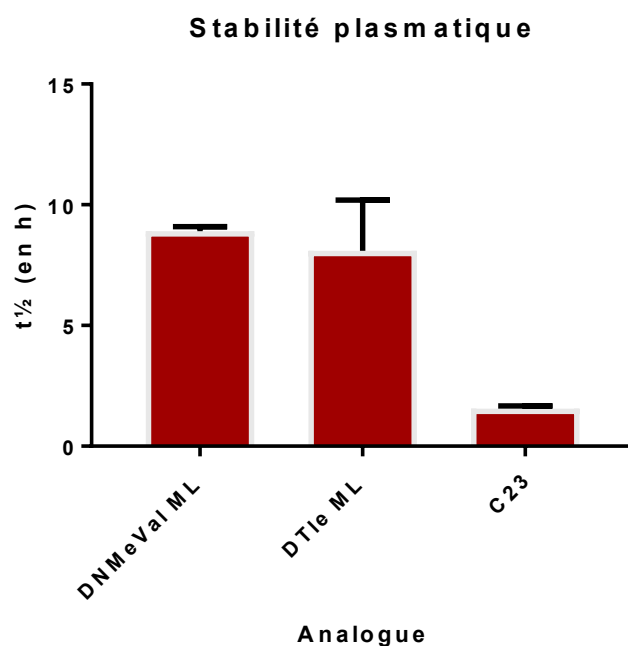


Figure 23. Valeurs de stabilité plasmatique d'analogues modifiés en position P3

Un mystère concernant ses résultats demeure. Il s'agit de l'absence de résultats chez les lignées cellulaires LNCaP pour les analogues modifiées en P3, mais n'ayant pas la modification D-Leu en P8. Effectivement, autant les analogues modifiés avec la N-méthyl-valine que ceux comportant une *tert*-leucine réagirent à un certain degré dans les essais cellulaires. Par contre, les analogues NMeVal ML et Tle ML, ayant la L-Leucine en P8, furent incapables de limiter la prolifération cellulaire des lignées LNCaP, alors qu'elles en furent capables chez DU145. On pourrait imaginer que la D-Leu en P8 est un facteur déterminant dans la perméabilité cellulaire, mais le fait qu'elle le soit uniquement chez DU145 et non pas chez LNCaP est un résultat atypique et difficilement explicable.

Malgré cette irrégularité inattendue dans nos résultats, le fait reste que l'analogue DTle ML comporte une valeur d'IC₅₀ très proche de C23 tout en ayant une stabilité plus de 5 fois supérieure, ce qui en fait a priori un analogue parfaitement viable pour remplacer C23, tenant pour acquis un bon profil toxicologique. L'analogue DNMeVal ML, malgré sa stabilité légèrement supérieure, a une activité antiproliférative plus faible qui en fait un candidat moins intéressant.

1.2.4. Modifications du noyau leucine (P5-P8)

Les positions P5 à P8 sont souvent appelées «noyau leucine» du peptide puisque chez les deux têtes de séries précédentes, le ML et le C23, elles sont composées exclusivement de leucines. Comme la section P1 à P4 est celle étant impliquée dans l'interaction avec la triade Asp/His/Ser du domaine catalytique de l'enzyme, on pourrait supposer que toute modification passée le résidu en P4 ne seront pas impliquées au niveau du site actif.⁷⁶ Un autre point corroborant cette théorie est le fait que la présence d'acide aminé en P5 à P8 est inutile afin d'obtenir de bonnes valeurs d'affinité en essai enzymatique. L'inhibiteur MI-1148 mentionné précédemment a d'ailleurs une activité picomolaire ($K_i = 40,2 \pm 4,7$ pM) chez la furine, et ce sans avoir de modifications en position P6 à P8. Elles furent toutefois conservées chez notre peptide, car le design original du peptide ML démontrait une meilleure affinité associée à la présence de leucines à ces positions. Les études subséquentes (détaillées dans le Chapitre 2) expliquent l'importance capitale qu'ont ces positions du peptide sur le profil pharmacocinétique de la molécule.

Considérant qu'elles ne sont pas impliquées directement dans la liaison au site actif, ces quatre positions ont été amplement modifiées dans l'étude de relation structure-activité précédant celle-ci. Un scan complet a été effectué à ces positions par Kwiatkowska *et al.*, notamment avec la norleucine,⁶⁵ l'homoleucine, la *tert*-leucine et plusieurs autres acides aminés comportant une chaîne latérale hydrophobe,⁷⁷ mais de longueur et d'embranchement variable. Bien que le design ou la synthèse de ces analogues ne soit pas de ma propre conception, je présenterai ici certains d'entre eux ayant des résultats positifs en termes de stabilité. Ceci est fait dans l'optique de la présentation de la dernière étape de l'étude de structure-activité, soit la combinaison des meilleures modifications en vue d'obtenir un effet additif ou synergique.

Les valeurs de K_i obtenues via scan à l'homoleucine et à la norleucine des positions P5 à P8 sont de l'ordre de ce qui est observé chez C23 (Figure 24). Les résultats démontrent une tendance où les analogues linéaires ont une inhibition légèrement plus élevée que C23 tandis que ceux avec des embranchements dans leur chaîne ont une inhibition légèrement plus faible. La variabilité entre les positions de la modification n'a d'ordre général que peu d'incidence sur l'affinité de l'analogue. La seule position donc la modification semble systématiquement associée à une perte d'affinité est la position P6, une tendance observée également chez plusieurs autres analogues modifiés à cette position.

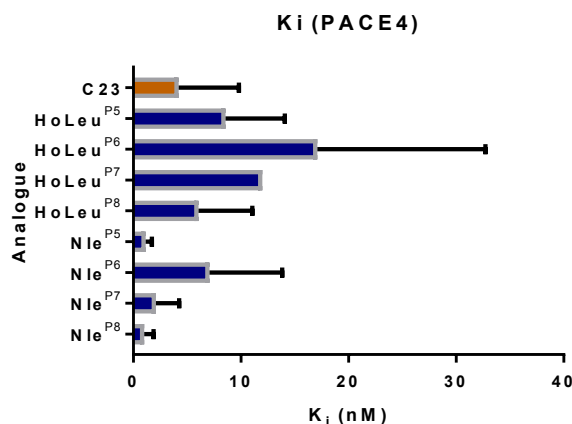


Figure 24. Histogramme comparatif des valeurs enzymatiques de certains analogues du scan en position P5 à P8

Quelques analogues combinés ont été synthétisés, comportant la même modification à plusieurs positions du peptide. L'un de ces exemples est un analogue avec la norleucine en P5 et P8 et ayant un IC_{50} de $40 \pm 10 \mu M$, ce qui est de l'ordre de C23. Cet analogue ayant de bonnes valeurs lors des essais

de prolifération, il fut également testé en essai de stabilité où $1,92 \pm 0,06$ h, soit un léger gain de stabilité par rapport à C23.⁷² Prendre note que l'erreur relative des valeurs d'inhibition de certains de ces composés est grande et qu'une comparaison précise avec celle de C23 n'est pas viable. On comprend toutefois qu'il s'agit de données semblables, et assurément du même ordre de grandeur.

L'essentiel de ces expérimentations en P5 à P8 peut donc se résumer par le fait que l'inclusion de résidus norleucine ou homoleucine n'a que très peu d'impact au niveau de l'affinité de la molécule pour l'enzyme et que la modification de la position P6 est généralement associée à une mauvaise affinité. Les données actuelles ne nous permettent pas d'expliquer clairement pourquoi cela est observé, mais on pourrait supposer que la longueur de la chaîne latérale alkyle en P6 doit être préservée telle quelle pour des questions d'affinité.

1.2.5. Modifications en N-terminal

La section N-terminale du peptide est la seconde cible des exoprotéases. Il s'agit également d'une autre section du peptide située à l'extérieur de la pochette catalytique lors de liaison à l'enzyme. Chez notre tête de série originale, le ML, l'amine libre en N-terminal est protégée par acétylation. Cette protection est toutefois très simple et nous avons de bonnes raisons de croire que des gains supplémentaires pouvaient être atteints en modifiant cette position. Le scan P5 à P8 effectué a révélé que l'ajout de D-Leu combiné à la modification Amba permettait d'obtenir une stabilité supérieure, donnant ainsi naissance au C23. La section N-terminale était donc été protégée à la fois par acétylation et par l'intégration de la D-Leu. Dans notre effort de raffiner la stabilité du peptide, nous avons proposé plusieurs modifications à cette position afin de vérifier si la stabilité pouvait être améliorée encore davantage. Les modifications en N-terminal se subdivisent en deux grandes catégories : les modifications en P8 et celles en P9 (Figure 25). Il sera d'abord question des analogues modifiés en P8.

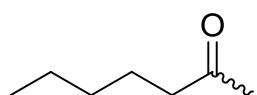
Les modifications en P8 sont largement basées sur le même rationnel que la modification ornithine en P1. On se rappelle que l'idée derrière cette modification était de préserver l'apparence de la chaîne latérale (dans ce cas-ci une arginine) tout en retirant la section facilement reconnue par les protéases, soit le carboxyle. Avec la majorité des analogues modifiés en P8, nous avons donc cherché à retirer l'amine libre N-terminale tout en conservant une chaîne latérale similaire. Toutefois, avec l'un d'entre

eux, nous avons cherché à ajouter une certaine polarité en cette position via l'ajout de l'acide 4-aminométhylphénylacétique (4-AMePhac 3ML) dans l'éventualité où la perte de polarité à cette position serait néfaste à l'affinité ou à la perméabilité de la molécule. Pour tous les analogues modifiés à cette position, l'absence d'amine en N-terminal signifie qu'il n'est plus nécessaire de la protéger via acétylation. Ces modifications permettent donc d'une part de protéger le N-terminal du peptide en retirant l'amine en plus de retrancher quelques atomes potentiellement superflus. Ceci est positif puisque plusieurs difficultés, généralement au niveau du profil pharmacocinétique, sont souvent identifiées chez les très grosses molécules.²⁰

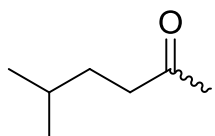
Contrairement à la très grande majorité des analogues testés, les analogues modifiés en P8 n'ont pas de variation D-Leu et L-Leu, car leur leucine en P8 est tout simplement remplacée par insertion d'une molécule n'ayant pas d'amine N-terminale, et donc par défaut pas de carbone alpha chiral. Les analogues ont été synthétisés par couplage en P8 d'une molécule ayant une fonction acide au lieu de l'acide aminé leucine qu'on y retrouverait chez C23. Le protocole de couplage est le même que celui utilisé en SPPS, à l'exception que le 6-Cl-HOBt, utilisé pour prévenir l'épimérisation du composé lors du couplage, n'a pas été utilisé vu l'absence de chiralité de la molécule à ce site. Les modifications utilisées sont l'acide 4-méthylpentanoïque (analogue IsoCap ML), de structure analogue à la leucine désaminée, l'acide hexanoïque (CapAc ML), l'acide pentanoïque (ValAc ML), l'acide 3-méthylbutanoïque (IsoVal ML), l'acide 2-méthylpentanoïque (2MeValAc ML) et l'acide 3-méthylpentanoïque (3MeValAc ML) en plus de l'autre analogue mentionné précédemment (4-AMePhac 3ML). L'amine de ce dernier était protégée par un groupement Boc lors du couplage afin d'éviter toute réaction secondaire pendant le couplage de l'acide lui-même, mais également du couplage subséquent de l'Amba.

~Leu—Leu—Leu—Arg—Val—Lys—Amba

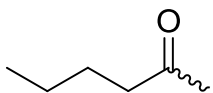
Modifications P8



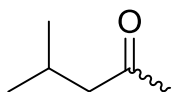
CapAc ML



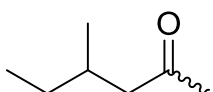
IsoCap ML



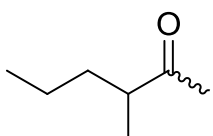
ValAc ML



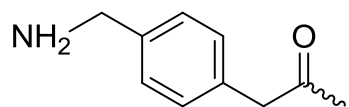
IsoVal ML



2MeValAc ML



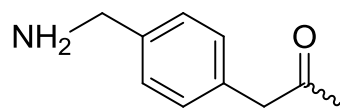
3MeValAc ML



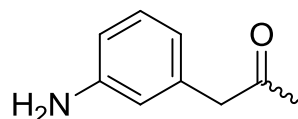
4-AMePhac 3ML

~DLeu/Leu—Leu—Leu—Leu—Arg—Val—Lys—Amba

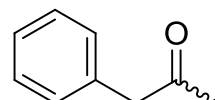
Modifications P9



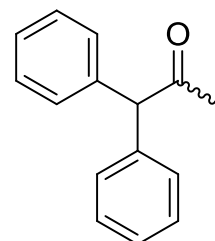
4-AMePhac (D)ML



3-Apaa (D)ML



Phac (D)ML



DiPhac (D)ML

Figure 25. Structure des modifications apportées à C23 en position P8 et P9

Les valeurs de K_i des analogues mimant la chaîne latérale hydrophobe, soit les analogues CapAc ML, IsoCap ML, ValAc ML, IsoVal ML, 2MeVal Ac et 3MeValAc ML, sont légèrement inférieures à C23, tel qu'illustré dans la Figure 27, suggérant que le retrait de l'acétylation, ou de l'amine elle-même, permet d'obtenir une meilleure affinité. Chez l'analogue polaire 4-AMePhac 3ML, on observe une baisse drastique de K_i par rapport à C23 (K_i 4-AMePhac 3ML = $0,046 \pm 0,02$ nM / K_i C23 = $4,9 \pm 0,9$ nM). 4-AMePhac 3ML ayant une basicité plus importante que les autres analogues testés, il serait plausible que ce paramètre soit responsable de la haute affinité observée puisque la basicité corrèle avec les valeurs de K_i . En effet, les analogues non chargés ont un K_i similaire à C23, l'analogue 4-Appa3ML (analogue issu d'une étude SRA précédente), ayant une charge partielle, a une valeur de K_i près de 20 fois inférieure tandis que l'analogue 4-AMePhac 3ML, ayant une charge formelle à pH physiologique, a une valeur de K_i plus de 100 fois inférieure à C23 (Figure 26).

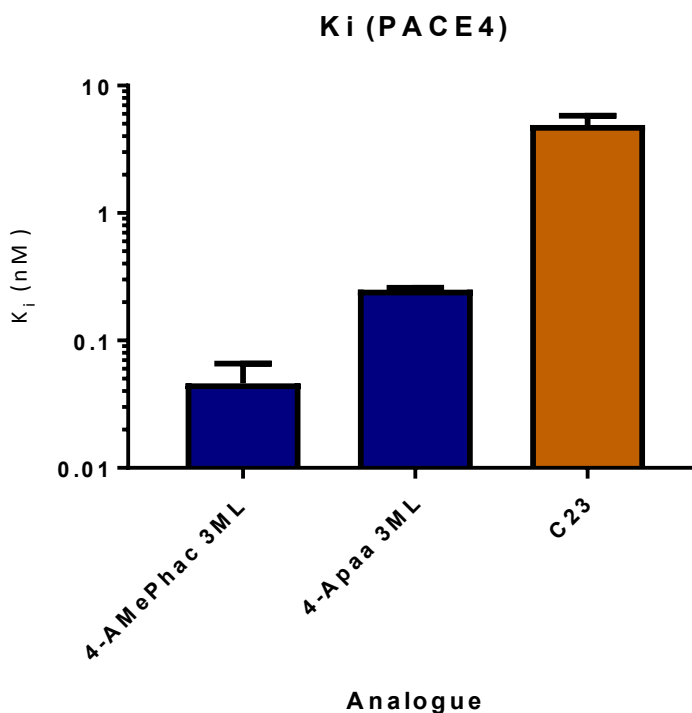


Figure 26. Inhibition enzymatique croissante en fonction de la polarité (Kwiatkowska. A & A. Foh-Dion, résultats non-publiés)

Les valeurs obtenues en termes d' IC_{50} sont plus variables toutefois, les analogues hydrophobes ValAc ML et Isoval ML ayant un IC_{50} nettement plus élevé que C23 et les autres analogues modifiés en P8 (Figure 27). L'analogue chargé 4-AMePhac 3ML quant à lui a été associé à des valeurs d' IC_{50} très

élevées, et ce malgré sa très grande affinité pour la cible, suggérant que l'ajout de polarité dans cette section de la molécule est associé à une forte perte de perméabilité. Nous avons vu précédemment que certaines portions du peptide sont très sensibles à un retrait d'hydrophobicité. Ceci semble également être cohérent avec l'absence d'activité antiproliférative des analogues ValAc ML et Isoval ML, le fait que ces analogues comportent un carbone de moins que les autres pouvant expliquer leur perte d'activité *in cellulo*. Considérant cela, seuls les quatre autres analogues, soit CapAc ML, Isocap ML, 2MeValAc ML et 3MeValAc ML ont été testés en essai de stabilité. Les valeurs de stabilité pour ces analogues furent toutefois très similaires à C23 et n'apportèrent aucun bénéfice de stabilité substantiel par rapport à notre tête de série (Figure 27). Leur stabilité est très similaire à ce que la D-Leu acétylée est capable de fournir. Si la taille du peptide devient un enjeu plus tard dans le développement du médicament, il s'agira d'options viables sur lesquelles se rabattre.

Les modifications N-terminales effectuées en P9 quant à elle se basent sur un principe différent. L'idée est de substituer l'acétylation N-terminale par un groupement volumineux, de façon à rendre la molécule plus difficile à reconnaître et plus difficile d'accès pour les protéases. Plusieurs groupements ont été étudiés, autant non chargés que polaires que chargés. Comme nous savions que la translation des valeurs de K_i en essai cellulaire est souvent dépendante de la polarité dans plusieurs sections clés de la molécule, l'utilisation d'analogues aux valeurs différentes dans ce paramètre devait nous permettre d'en identifier un étant efficace *in cellulo*. Les analogues testés ont été couplés en P9 avec l'acide phénylacétique (Phac ML), l'acide diphénylacétique (DiPhac ML), l'acide 4-aminométhylphénylacétique (4-AMePhac ML) et l'acide 3-aminophénylacétique (3-Apaa ML), avec ou sans la modification D-Leu en P8 pour un total de huit analogues (Figure 25). Tout comme pour l'analogues 4-AMePhac 3ML, les peptides comportant ces modifications furent protégés par un groupement Boc au niveau de l'amine.

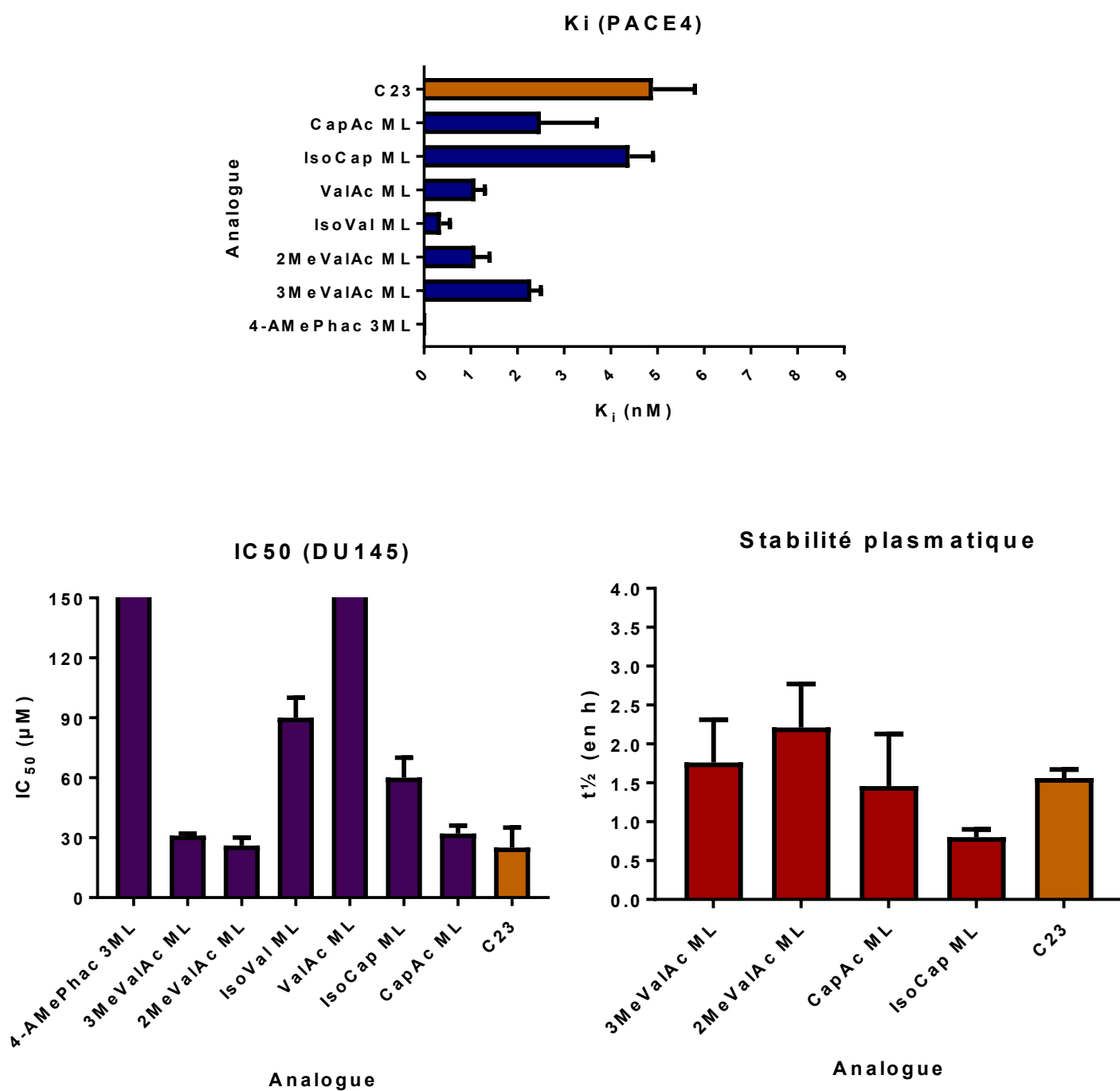


Figure 27. Valeurs d'activité enzymatique, d'activité antiproliférative et de stabilité plasmatique des analogues modifiés en position P8

Avant même la tenue des premiers essais enzymatiques, les analogues Phac ML et DiPhac ML, avec ou sans D-Leu, s'avéraient déjà problématiques, leur solubilité laissant à désirer. Une solubilité acceptable put être atteinte par dilution préalable dans le DMSO 5%. Considérant l'hydrophobicité considérable ajoutée à cette position par la permutation de l'acétyle par un phényle, cette perte de solubilité importante avait été envisagée comme un problème potentiel. Les valeurs de K_i obtenues chez ses analogues sont similaires à celle de notre tête de série, avec une tendance indiquant de meilleurs résultats chez les analogues chargés (4-AMePhac ML et 4-AMePhac dML) que partiellement chargés (3-Apaa ML et 3-Apaa dML), eux-mêmes étant supérieurs aux analogues non chargés (Phac ML, Phac dML, DiPhac ML et DiPhac dML). Sur le plan cellulaire, la perte d'activité observée chez l'analogue 4-AMePhac 3ML n'est pas observée chez les analogues de cette série modifiés en P9. Les analogues Phac ML et Phac dML ont démontré des valeurs du même ordre tandis que les analogues DiPhac ML et DiPhac dML s'avérèrent très toxiques et causèrent la mort systématique des cellules, possiblement pour des raisons de faible solubilité, d'où impossibilité d'évaluer l'activité antiproliférative de ces composés. Considérant les éventuels problèmes de solubilité pouvant être entraînée par Phac ML et Phac dML, seuls les quatre analogues modifiés en P9 chargés ou partiellement chargés furent testés en stabilité. Les demi-vies obtenues pour ces composés sont considérablement supérieures à C23, en particulier chez ceux modifiés avec la D-Leu (Figure 28). De plus, les analogues ont des activités antiprolifératives similaires à C23, ce qui en fait des candidats viables afin de le remplacer. Le principal bémol par rapport à ces résultats est que la hausse de stabilité se fait conjointement à un ajout de charge (ou charge partielle), ces dernières étant reconnues pour être problématiques en termes de toxicité. Il est impossible de dire à cette étape si les composés seront effectivement toxiques chez un modèle animal, mais il est important de garder cette considération en tête.

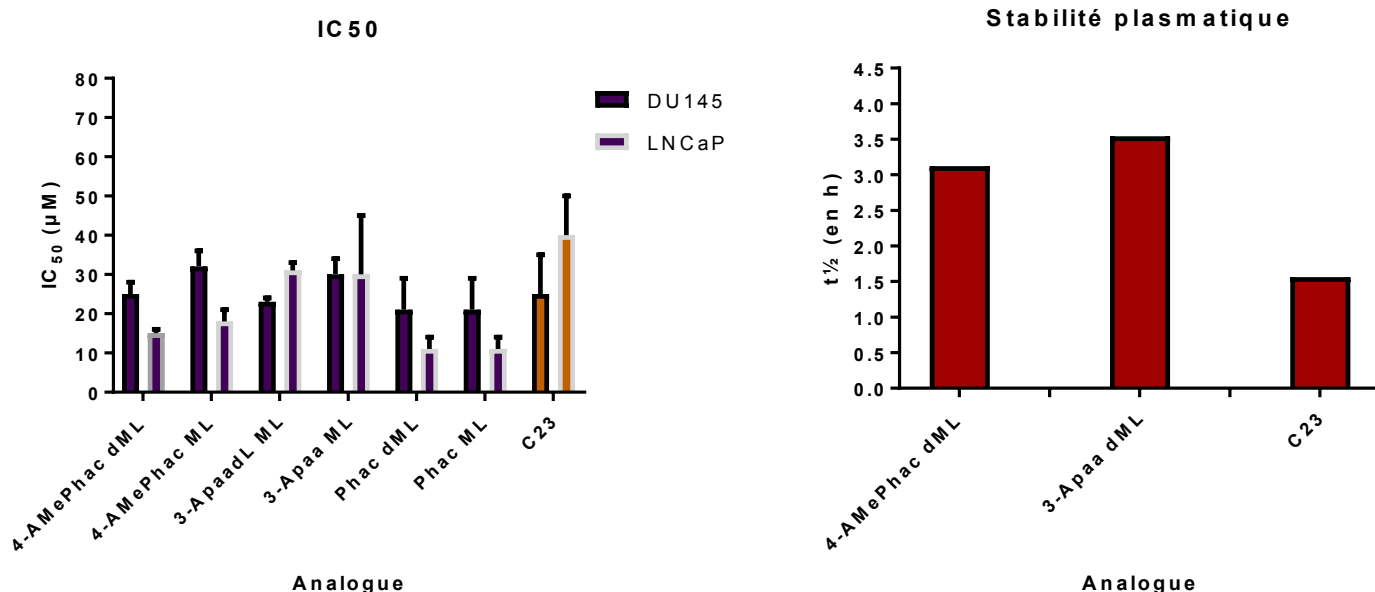
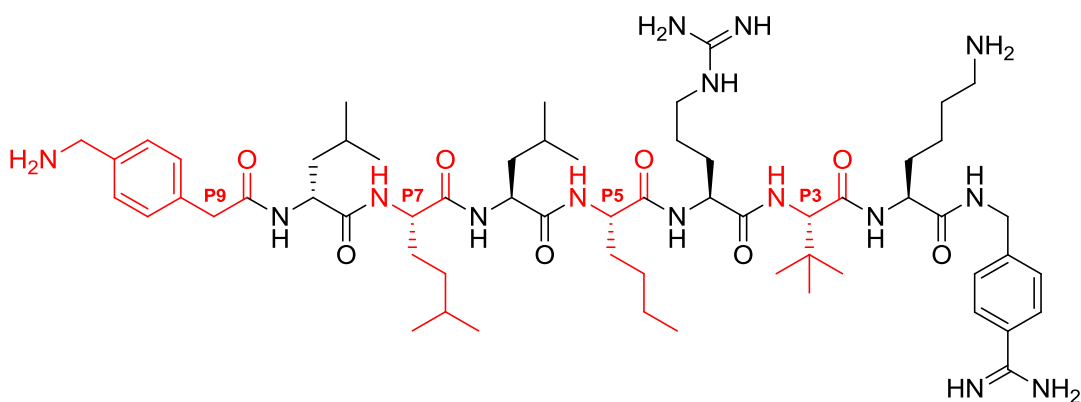


Figure 28. Valeurs d'activité antiproliférative et de stabilité plasmatique des analogues modifiés en position P9

1.2.6. Modifications combinées

Nous avons passé en revue plusieurs positions du peptide C23 en vue d'améliorer sa stabilité, et synthétisé de nombreux analogues de la tête de série. Certains de ces résultats s'avèrent plus positifs que d'autres et notre objectif à cette étape est de combiner les meilleures modifications bioisostériques afin d'évaluer si un effet additif ou synergique peut être obtenu, autant sur le plan de la stabilité que sur l'activité dans le modèle cellulaire. Bien entendu, il est possible que l'effet inverse soit observé, à savoir que l'ajout de plusieurs modifications cause une perte de stabilité, d'affinité ou d'activité antiproliférative, d'où la nécessité de tester chacune des combinaisons.



4-AMePhac ML-dL-**H**omoLeu-L-**N**orLeu-R-Tle ML-K-Amba

AHN

Figure 29. Structure de l'inhibiteur AHN, un des 8 analogues à modifications combinées synthétisés

Les principales modifications ayant un effet positif sur la stabilité du composé sans toutefois compromettre l'activité antiproliférative sont la *tert*-leucine en P3, l'homoleucine ou norleucine en P5, P7 ou P8 ainsi que l'acide 4-aminométhylphénylacétique ou acide 3-aminophénylacétique en P9. La D-Leucine étant déjà une modification connue et efficace, elle ne fut pas changée dans cette première série de modifications combinées. Le motif choisi pour nos analogues fut donc le suivant : Amba en P1, lysine en P2, *tert*-leucine en P3, arginine en P4, homoleucine ou norleucine en P5, leucine en P6, homoleucine ou norleucine en P7, D-leucine en P8 et l'acide 4-aminométhylphénylacétique ou acide 3-aminophénylacétique en P9 (Figure 29) pour un total de huit analogues.

Les huit analogues ont réagi de façon relativement prévisible dans les essais enzymatiques. Les analogues modifiés en P9 avec l'acide 4-aminométhylphénylacétique ont obtenu des valeurs de K_i plus basses que celles modifiées avec l'acide 3-aminophénylacétique, tout comme chez leurs analogues non modifiés aux autres positions. Toutefois, les valeurs globales de K_i sont plus élevées que chez ces autres analogues, probablement dûs à la présence de groupements ayant une influence légèrement à la hausse sur le K_i de l'analogue telles l'homoleucine et la norleucine en P5 ou P7 et la *tert*-leucine en P3 (Figure 30). Cet effet est facilement observable chez plusieurs analogues, notamment le 3HN.

Les données en IC_{50} suivent la même tendance que les K_i , ce qui est à l'inverse des résultats observés précédemment chez les analogues modifiés avec l'acide 3-aminophénylacétique qui avaient une activité en enzyme moins prononcée que ceux avec l'acide 4-aminométhylphénylacétique, mais une activité très légèrement supérieure en cellule. Cette nouvelle série de résultats démontre la présence d'un effet synergique entre l'acide 4-aminométhylphénylacétique et les modifications additionnelles (Figure 30). En effet, alors que la modification acide 3-aminophénylacétique combiné avec l'homoleucine et/ou norleucine plus *tert*-leucine donne un résultat situé entre les valeurs respectives des modifications seules, la modification acide 4-aminométhylphénylacétique combiné avec d'autres modifications donne une valeur d' IC_{50} plus faible que n'importe quelle modification par elle-même. Ces données, bien qu'encourageantes, restent préliminaires et n'ont été testées qu'à une seule reprise.

On observe chez les analogues modifiés avec l'acide 3-aminophénylacétique que la différence entre les valeurs d' IC_{50} de ces derniers et celle de C23 est beaucoup plus petite que la différence entre les valeurs de K_i . Effectivement, les valeurs de K_i des analogues modifiés étaient plus élevées, voire significativement plus élevées que celle de C23 alors que les valeurs d' IC_{50} sont plus faibles ou égales à celle de C23. Une façon d'expliquer ce résultat serait d'assumer un plafonnement des données d'essai cellulaires dû à une limitation au niveau de la perméabilité. Une autre hypothèse serait que la stabilité des composés modifiés est considérablement supérieure à celle de C23.

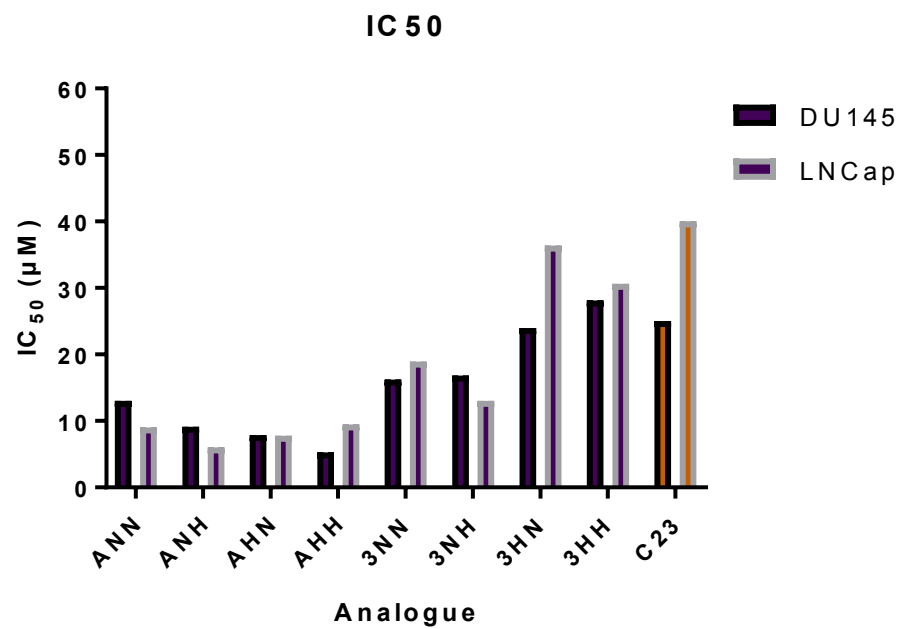
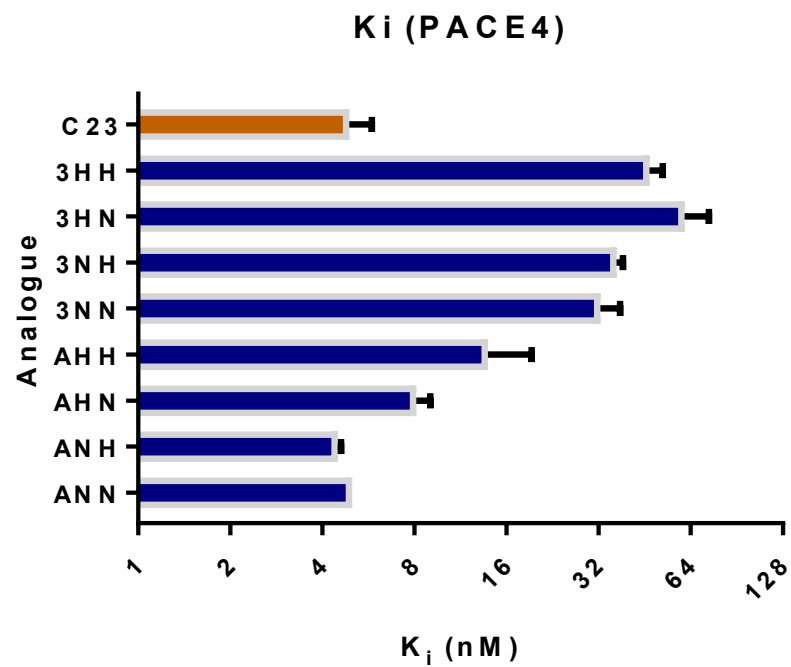


Figure 30. Valeurs d'inhibition enzymatique et d'activité antiproliférative des analogues à modification combinées

Il faut prendre note que la principale variabilité dans les résultats de K_i et d' IC_{50} est entre le groupe avec l'acide 4-aminométhylphénylacétique et celui avec l'acide 3-aminophénylacétique, la variabilité en fonction des modifications en P5 ou P7 étant minime. Les modifications homoleucine et norleucine ne semblent pas avoir un impact aussi important sur les résultats que la modification présente en P9.

Tous les analogues ayant performé pratiquement aussi bien ou mieux que C23 dans les essais cellulaires, la série complète d'analogues aux modifications combinées fut testée en essais de stabilité. Les valeurs obtenues lors de ces expérimentations furent égales ou supérieures à celle observée chez l'analogue DTle ML, soit l'analogue à modification unique ayant présenté la meilleure valeur de stabilité ($t_{1/2} = 8,1 \pm 2,1$ h) tout en conservant des valeurs d' IC_{50} relativement proches de C23. En plus de cela, mais les valeurs d' IC_{50} sont également supérieures à celles de DTle ML, ce qui est un autre point positif important. Aucun effet synergique fort n'est observable niveau stabilité, mais un certain effet additif l'est par contre. Les analogues aux modifications combinés ont des valeurs de stabilité oscillant entre 8,0 et 16,0 h, ce qui est supérieur aux analogues à modification unique (Figure 31). Ces résultats, bien que préliminaires, illustrent très clairement la stabilité plasmatique supérieure de ces composés. Tout comme avec les valeurs de K_i ou d' IC_{50} , les valeurs de stabilité ne semblent que très peu affectées par le type de modification utilisée en P5 et P7. La tendance initiale semble indiquer que les analogues avec l'acide 3-aminophénylacétique sont plus stables avec la modification homoleucine que norleucine, et ceux avec l'acide 4-aminométhylphénylacétique sont plus stables avec la norleucine. Ces résultats étant préliminaires, cette tendance reste toutefois à confirmer. L'effet de la modification en P9 quant à lui semble assez marqué, la demi-vie moyenne des analogues comportant l'acide 4-aminométhylphénylacétique étant plus élevée que celles des analogues comportant l'acide 3-aminophénylacétique, et ce par une marge de plus de 5 heures. Il est intéressant de constater cet effet alors que les modifications uniques en P9 ne présentaient pas de différence de stabilité marquée l'une avec l'autre. Les analogues portant l'acide 4-aminométhylphénylacétique semblent donc bénéficier d'un effet synergique de stabilité que les autres n'ont pas, tout comme au niveau de leur activité enzymatique d'ailleurs.

Certains détails expérimentaux importants sont à considérer avant de songer à remplacer définitivement notre tête de série originale. Tout d'abord, le protocole d'essai de stabilité a dû être modifié avec ces peptides puisqu'ils précipitaient dans le MeOH, rendant impossible l'injection dans l'UPLC. Les

analogues avec l'acide 3-aminophénylacétique ont dû être précipités dans une solution MeOH:ACN (50:50 v/v) et les analogues avec l'acide 4-aminométhylphénylacétique dans une solution MeOH:H₂O (50:50 v/v) avec 0,01M HCl. Considérant que le flux sanguin est majoritairement composé d'eau et que le produit est facilement soluble dans l'eau, ceci ne devrait pas être un problème, mais il s'agit tout de même d'une information à garder à l'esprit. Certaines considérations importantes demeurent par rapport à ces résultats. La première est que la valeur de stabilité de C23 à laquelle ils sont comparés a été effectuée dans le méthanol pur, au lieu d'un mélange 50:50, ce qui pourrait peut-être fausser les résultats. On note aussi que chez les analogues modifiés avec l'acide 4-aminométhylphénylacétique en P9, une courbe dose-réponse très abrupte et souvent irrégulière a été observée. Ces résultats suggèrent une certaine toxicité chez ces composés qui devrait être vérifiée via une expérimentation dédiée à l'évaluation de la toxicité. Considérant la toxicité possible des analogues avec l'acide 4-aminométhylphénylacétique, il serait probablement hâtif de les considérer comme strictement supérieurs aux autres analogues simplement sur la base de résultats de stabilité supérieurs. Bref, il est à ce stade difficile d'isoler un seul des huit analogues qui serait particulièrement supérieur aux autres en fonction des résultats actuels. Bien que l'on pourrait voir ceci comme un problème, il s'agit peut-être en réalité d'un avantage : si un ou plusieurs de ces produits présente des inconvénients au niveau de son profil pharmacocinétique, nous avons plusieurs autres alternatives possibles à tester qui n'auront potentiellement pas les mêmes problèmes.

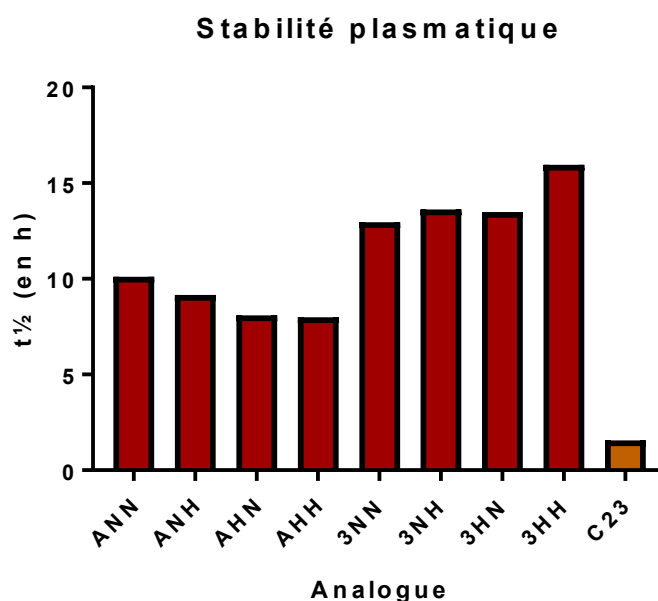


Figure 31. Valeurs de stabilité plasmatique des analogues à modification combinées

En conclusion, nos efforts de modifications bioisostériques à plusieurs positions de l'inhibiteur C23 nous ont permis d'identifier une série de huit analogues ayant une activité antiproliférative légèrement supérieure à notre tête de série en plus d'avoir une stabilité plasmatique de 5 à 10 fois supérieure. Nous avons donc réussi à atteindre notre objectif via cette approche.

1.3. Approche macrocyclique

L'approche macrocyclique est une façon alternative d'augmenter la stabilité d'une molécule qui consiste à créer un cycle de 12 atomes ou plus (d'où le nom «macrocycle») afin de verrouiller la molécule dans une certaine conformation, réduisant considérablement son entropie. Bloquer la conformation de la molécule a plusieurs conséquences, autant positives que négatives.^{78,79}

Les effets positifs de la macrocyclisation sont nombreux et justifient largement cette approche souvent plus complexe sur le plan synthétique. La macrocyclisation peut rendre la molécule plus difficile à reconnaître par des enzymes capables de la dégrader, augmentant par ce fait même sa stabilité. En bloquant la molécule dans une conformation adaptée au site actif, on empêche la molécule d'adopter d'autres conformations qui pourraient ne pas avoir d'affinité pour la cible, augmentant ainsi l'affinité globale de la molécule. Ces conformations non spécifiques peuvent également être responsables d'importants effets secondaires et le fait que la molécule soit incapable d'adopter ces conformations est donc garante de moins de ces effets adverses. Un autre avantage souvent observé chez les macrocycles peptidiques est la possibilité d'adopter une conformation spécifique en milieu aqueux, et une conformation spécifique en milieu hydrophobe. En se repliant de façon à camoufler leurs groupements polaires, les molécules macrocycliques peuvent atteindre d'excellentes valeurs de perméabilité tout en étant capables de se déplier au sein de la cellule et de lier la cible via ses groupements polaires. Prendre note que la présence d'une conformation préférentielle polaire et d'une conformation préférentielle hydrophobe n'est pas quelque chose d'exclusif aux macrocycles, mais la structure cyclique assiste grandement à l'interconversion entre les deux formes.^{80,81}

D'un autre côté, la macrocyclisation est une méthode comportant de nombreux inconvénients. On peut très bien macrocycliser une molécule dans une conformation inadaptée à sa cible, la dénuant ainsi de l'effet recherché.⁷⁹ Il s'agit donc d'une méthode qui a le potentiel d'offrir d'excellents résultats, mais qui peut très souvent causer de lourdes pertes d'affinité pour la cible. Il est possible d'essayer de prédire les configurations voulues avant la macrocyclisation, mais cela requiert un bon modèle cristallographique de la cible. Il faut également être conscient que même avec le meilleur modèle et les meilleurs logiciels prédictifs, le résultat ne sera pas aussi bon que souhaité à tout coup, la macrocyclisation reposant donc toujours jusqu'à un certain point sur une approche essai-erreur.

Un des premiers macrocycles peptidiques utilisés en clinique fut la cyclosporine, un agent immunosuppresseur ayant un temps de demi-vie systémique d'environ 24h (Figure 32).⁸² Le design de cette molécule est d'origine naturelle, la cyclosporine ayant été découverte telle quelle dans la nature. Cette structure cyclique entraînant une stabilité massive a servi d'inspiration pour plusieurs médicaments de synthèse, historiquement dans le traitement des infections, mais dans une variété grandissante d'applications, notamment en oncologie ou chez les maladies cardiovasculaires.⁸³

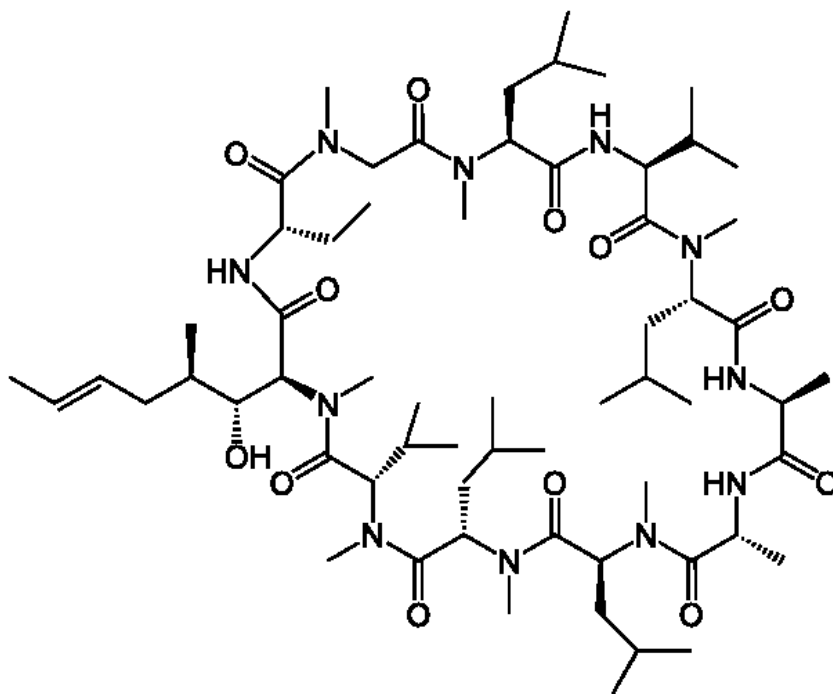


Figure 32. Structure de la cyclosporine, un agent thérapeutique macrocyclique naturel

La macrocyclisation de médicaments existants est une avenue utilisée à ce jour par les grandes compagnies pharmaceutiques. Prenons par exemple le Crizotinib (Xalkori), médicament contre le cancer du poumon développé par Pfizer. Une nouvelle version du médicament, le Lorlatinib, a été développée en macrocyclisant la molécule originale (Figure 33).⁸⁴ Ce produit de nouvelle génération a une meilleure stabilité en plus d'une perméabilité accrue qui lui permet de passer la barrière hématoencéphalique. Ce dernier point en particulier constitue un avantage important, puis qu'il permet au médicament de traiter les métastases au niveau du cerveau.⁸⁵ Cet exemple illustre non seulement la puissance de cette approche, mais également ses bénéfices sur de multiples paramètres de la molécule.

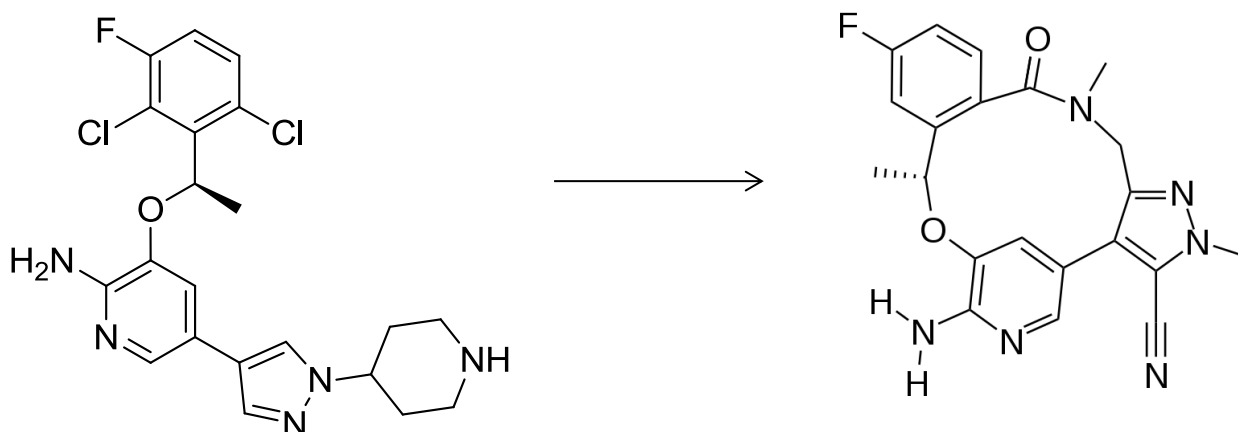


Figure 33. Structure du Crizotinib (à gauche) versus son analogue macrocyclisé, Lorlatinib (à droite)

Des efforts de macrocyclisation ont déjà été tentés préalablement sur la molécule ML, mais l'analogue cyclique tête-à-queue (donc où la leucine en P8 et l'arginine en P1 sont couplés) n'a pas démontré de résultats concluants en essai enzymatique ($K_i = 900 \pm 200$ nM).⁸⁶ Des avenues alternatives de macrocyclisation ont donc été investiguées afin d'identifier une structure permettant de lier efficacement PACE4.

Considérant que la structure du peptide est essentiellement la même, à l'exception bien sûr d'un certain gain d'hydrophobicité associé à la perte de la portion acide en C-terminal, on peut présumer que la contrainte stérique associée à la macrocyclisation tête-à-queue est responsable de sa perte d'affinité. Il est donc légitime de présumer que la section de l'inhibiteur liant la cible, soit la section RVKR de la molécule, est déformée par la cyclisation, ou à tout le moins se voit incapable d'adopter une conformation liante. Dans cette optique, une façon logique de cycliser l'inhibiteur sans affecter la section liante serait d'effectuer une cyclisation n'impliquant aucune contrainte sur cette partie de la molécule.

Avec cette idée en tête, nous avons synthétisé, dans le cadre d'une étude plus large de macrocyclisation, l'analogue Mpa3LC, soit un analogue de C23 cyclisé entre les positions P5 à P9.⁸³ La leucine en P5, une position qui contrairement à d'autres peut être modifiée sans perte significative d'affinité, a été permutée par une cystéine et l'acétylation en P9 par un acide mercaptopropionique, soit essentiellement une cystéine désaminée. La macrocyclisation a été effectuée par génération d'un pont disulfure entre les

atomes de soufre de ses deux molécules. Noter également que les trois leucines séparant les positions P5 à P9 sont d'isométrie L. La synthèse de cet inhibiteur macrocyclique est très similaire à celle de n'importe quel autre analogue de C23, la seule différence importante étant au niveau de la macrocyclisation. Une fois la molécule d'Amba couplée au peptide, les protections des chaînes latérales retirées et le composé lyophilisé, le produit est solubilisé dans un large volume de tampon bicarbonate de sodium avec du DMSO (Figure 34). L'utilisation d'un large volume de tampon est nécessaire pour des raisons d'entropie, afin de défavoriser les réactions intermoléculaires qui mèneraient à des dimères non voulus au lieu du macrocycle désiré.⁷⁹

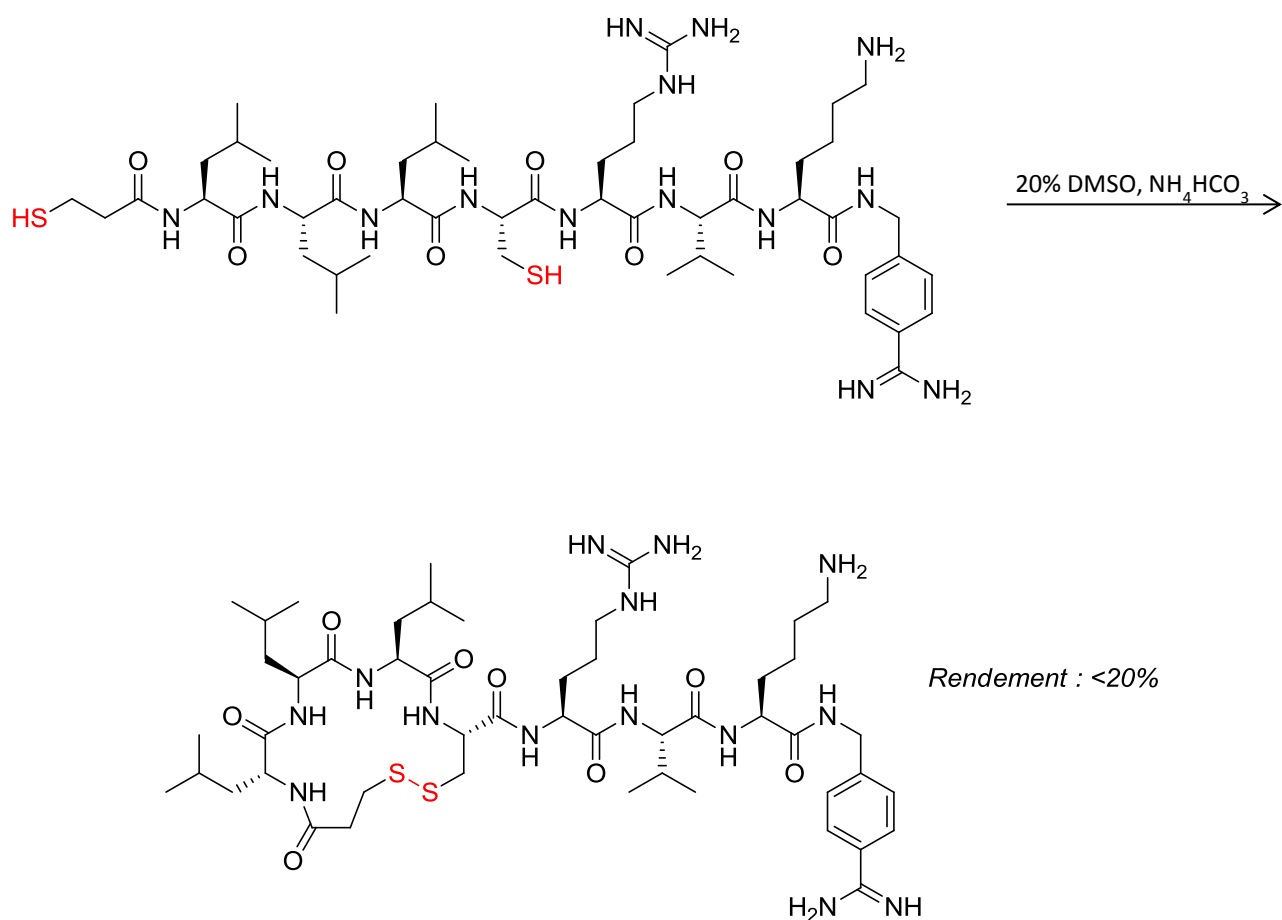


Figure 34. Macrocyclisation de l'analogue Mpa3LC

Conformément à nos attentes, ne pas imposer de contraintes stériques à la hauteur du site liant de l'analogue macrocyclique nous a permis d'obtenir un composé actif en essai enzymatique. Toute sélectivité pour la PACE4 versus la furine a été perdue cependant, le composé étant même légèrement

plus sélectif pour la furine. Les valeurs d'IC₅₀ obtenues sont dans le spectre de celles observées chez C23. Ceci est un résultat encourageant en soi, car nous avons vu précédemment qu'il faut très peu de variation de polarité en P9 pour que l'analogue perde toute activité en cellule, ce qui ne fut pas le cas ici. Toutefois, bien que la stabilité plasmatique de Mpa3LC soit supérieure à celle de C23 (t_{1/2} Mpa3LC = 2,9 h), la hausse de stabilité observée est relativement faible par rapport à ce que d'autres modifications ont pu démontrer. Ce gain de stabilité plus faible que chez d'autres analogues et la sélectivité pour la furine font de Mpa3LC un candidat inadéquat pour le rôle de tête de série.

Tableau 4. Comparaison des valeurs d'affinité enzymatique, d'activité antiproliférative et de stabilité métabolique de l'analogue macrocyclique Mpa3LC avec C23

	K _i PACE4 (nM)	K _i Furine (nM)	IC ₅₀ DU145 (μM)	IC ₅₀ LNCaP (μM)	t _{1/2} (h)
Mpa3LC	35 ± 2	19 ± 5	60 ± 10	85 ± 5	2,9
C23	4,9 ± 0,9	9,8 ± 2,0	25 ± 10	40 ± 10	1,56 ± 0,11

La macrocyclisation demeure une avenue intéressante afin d'augmenter la stabilité de C23, mais le fait que la cyclisation tête-à-queue soit impossible implique qu'une assez grande flexibilité est nécessaire à la position P1 à P4 du peptide. Or, la formation d'un macrocycle excluant cette section ne permet pas de la protéger adéquatement contre les endopeptidases clivant à cette position, d'où les gains limités. Une autre option serait d'agrandir davantage la molécule pour cycliser sans imposer de contraintes stériques, mais un macrocycle trop grand n'aurait probablement pas le bénéfice escompté niveau stabilité en plus d'ajouter de nombreux problèmes associés aux molécules de trop grande taille. Une possibilité envisageable serait de cycliser à partir de la position P3 avec un résidu dont la chaîne latérale est orientée à l'extérieur du site actif, mais ce genre de cyclisation demanderait sûrement un très haut degré de précision afin de conserver l'affinité de la molécule pour la cible. Ce genre d'investigation nécessiterait certainement un très bon modèle cristallographique de la PACE4 afin de pouvoir prédire des structures macrocycliques efficaces, modèle qui n'existe pas à l'heure actuelle. Il s'agit donc d'une option qui, bien que possible, est peu intéressante dans l'immédiat, d'autant plus que le bénéfice potentiel reste incertain.

1.4. Approche par greffe intrapeptidique

La greffe intrapeptidique est une approche novatrice décrite dans la littérature qui consiste à intégrer une séquence d'acides aminés reconnue par une cible spécifique dans un vecteur stable.^{87,88} Le vecteur généralement utilisé est le SFTI-1 (Figure 35), un inhibiteur de trypsine retrouvé dans les graines de tournesol.^{89,90} Il s'agit d'un peptide non toxique et très stable, cette stabilité s'expliquant entre autres par la macrocyclisation du composé via cyclisation tête-à-queue en plus d'un pont disulfure entre les deux cystéines. L'objectif de la greffe intrapeptidique est d'insérer ou de substituer une séquence d'acide aminé reconnue par la cible au sein du peptide SFTI-1, permettant ainsi d'obtenir une molécule

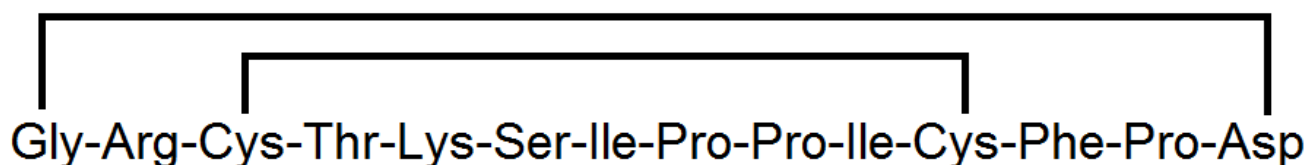


Figure 35. Structure du vecteur peptidique SFTI-1

stable et ayant une affinité pour la cible. Cette technique a déjà été décrite par Fittler *et al.* où cette stratégie est utilisée afin de produire un inhibiteur stable ciblant la furine.⁹¹ Le motif liant R/X/K-R/K de la furine est conservé et intégré au sein du SFTI-1 afin d'obtenir des molécules avec des affinités d'ordre picomolaire (Figure 36). Prendre note que dans ce cas en particulier, il n'y a pas eu de cyclisation tête-à-queue, soit du C-terminal avec le N-terminal, mais seulement macrocyclisation via pont disulfure.

Table 1. Synthesized inhibitors and their inhibition constants against furin. Residue numbering according to Schechter and Berger. ^[28]													
	P5 1	P4 2	P3 3	P2 4	P1 5	P1'-P4' 6-9	10	11	12	13-14	C terminus	K _i [nM]	Error [nM]
10	K	R	C	K	K	SIPP	R	C	H	PD	OH	3.8	0.2
11	K	R	C	K	K	SIPP	I	C	F		NH ₂	0.49	0.04
12	K	R	C	K	K	SIPP	I	C			NH ₂	0.71	0.04
13	K	R	C	K	K	SIPP	R	C			NH ₂	4.7	0.1
14	K	R	C	K	K	SIPP	A	C	F		NH ₂	3.7	0.2
15	K	R	A	R	K	SIPP	R	A	H	PD	OH	2373	87
16	K	R	Aha	K	K	SIPP	I	Pra			NH ₂	21.8	0.6
17	K	R	Aha	K	K	SIPP	I	Pra			NH ₂	5.0	0.4

Figure 36. Structure et valeurs enzymatiques d'inhibiteurs de furine (Fittler *et al.*)

Malgré ces valeurs de K_i d'ordre nanomolaire, voire sous-nanomolaire (Figure 36), aucune valeur d'essai cellulaire ou de stabilité n'est montrée, ce qui rend impossible de dire si une application réelle de ce peptide est possible. L'ajout d'une lysine en P5 permet certainement l'augmentation substantielle du K_i de la molécule, mais ce genre de modification peut être associé à une perte de perméabilité ou une hausse de toxicité. Notre objectif était donc de vérifier si l'application de ce genre de stratégie était viable dans un modèle biologique afin d'obtenir un inhibiteur peptique stable.

Le premier peptide que nous avons synthétisé est basé sur la structure du SFTI-1 (Figure 35), à l'exception que la section Arg-Cys-Thr-Lys a été permutée par la séquence Leu-Leu-Arg-Cys-Lys-Arg. Nous savions à l'époque que la position P6 était essentielle à l'activité des analogues de C23 autant en essai enzymatique qu'en essai cellulaire, d'où conservation de cette séquence chez l'analogue greffé. La synthèse s'est effectuée selon le protocole usuel, puis la macrocyclisation par pont disulfure de la molécule a été effectuée dans des conditions similaires à celles décrites précédemment (Figure 37). Cet analogue 1 (ML-SFTI) s'est toutefois avéré être inefficace en cellule. Une de nos hypothèses était que le pont disulfure était réduit à l'intérieur de la cellule, facilitant ainsi le reste de la dégradation du peptide. Afin d'investiguer cette hypothèse, nous avons produit un analogue 2 (ML-SFTI TB) où la cyclisation de la molécule fut effectuée non pas via un pont disulfure, mais via réaction avec le (E)-1,4-dibromo-2-butène. La réduction *in cellulo* de pont disulfure est une réaction enzymatique bien documentée⁹² et relativement simple par rapport à une hypothétique réduction d'un lien carbone-souffre. Ainsi, l'efficacité, ou absence d'efficacité, de cet analogue en cellule devait nous donner l'heure juste sur la question de la réduction du pont disulfure. Les résultats observés en cellule avec l'analogue 2 ne furent pas différents de ce qui fut observé chez l'analogue 1, confirmant qu'une dégradation du pont disulfure n'était probablement pas la cause du manque d'activité *in cellulo*.

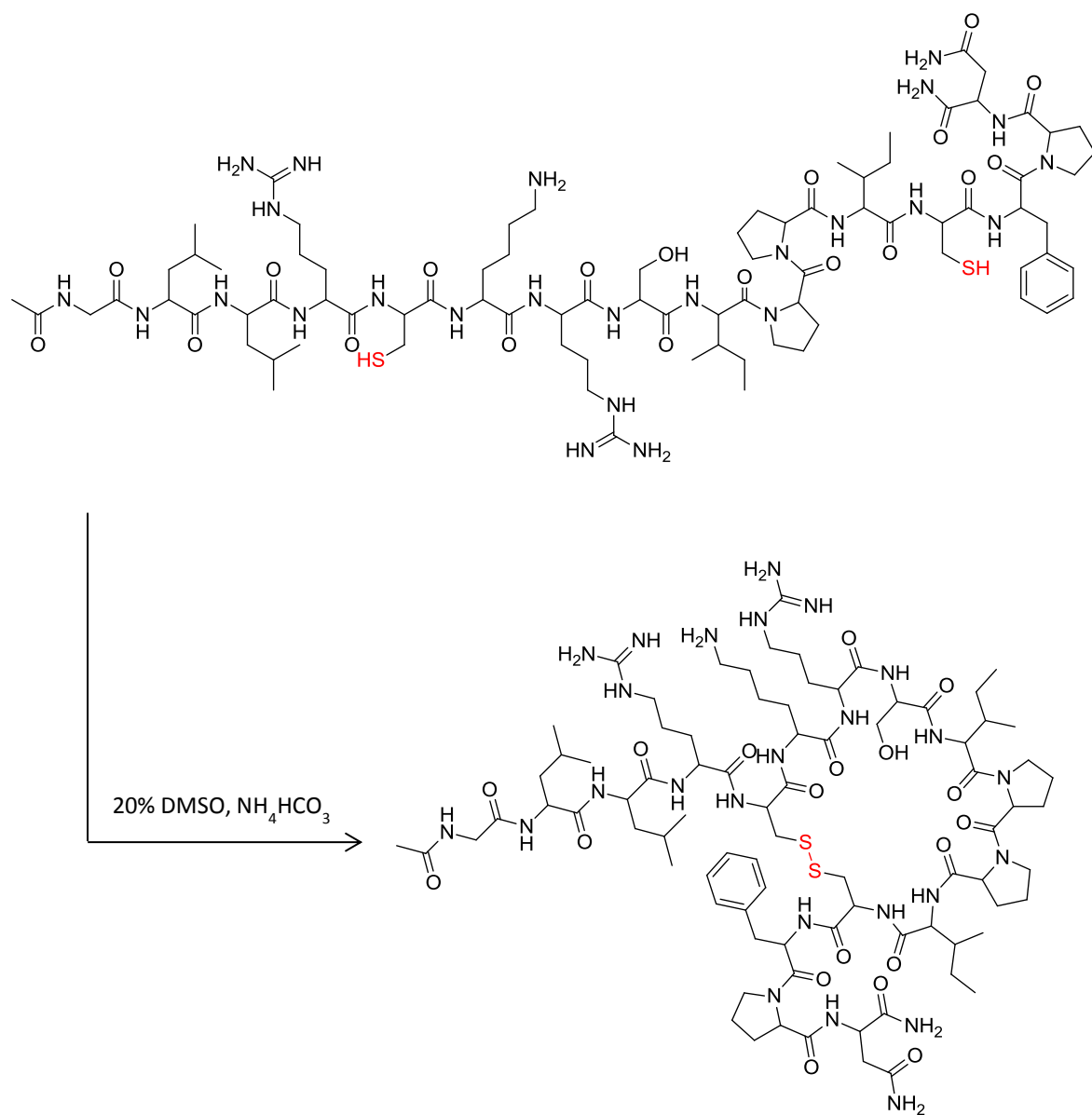


Figure 37. Macrocyclisation de l'analogue 1, ML-SFTI (Ac-GLLRCKRSIPPICFPD)

Des études subséquentes, décrites dans le chapitre 2, ont démontré que la leucine en position P8 est un élément essentiel à la perméabilité chez les analogues de C23 standard. Nous avons donc présumé que l'absence des quatre leucines en amont de la séquence R/X/K/R était responsable d'une absence de perméabilité de l'analogue ML-SFTI, et donc des résultats négatifs observés en essai cellulaire. Nous avons donc synthétisé l'analogue 3 (4L-SFTI TB) (Figure 38), de structure identique à l'analogue 2 à l'exception que l'entière séquence LLLLRCKR y était intégrée. Le produit fut testé en essai cellulaire où il obtint une valeur d'IC₅₀ de 62 µM avec la lignée DU145 et 164 µM chez la lignée LNCaP, soit les premiers résultats MTT positifs obtenus chez ce type d'inhibiteur peptidique (Tableau 5). Ces résultats laissent croire que la présence des quatre leucines en amont de la séquence R/X/K/R est essentielle à la perméabilité des analogues SFTI-1 au même titre que chez les analogues standards. Les valeurs restent toutefois trop élevées afin que 4L-SFTI TB puisse être considéré comme un analogue apte à remplacer C23, mais il est très intéressant de voir que cette façon de faire alternative peut bel et bien constituer une avenue possible afin de produire des inhibiteurs peptidiques stables. Ceci étant dit, nos valeurs préliminaires ne nous permettent pas de conclure l'efficacité réelle d'un inhibiteur de PACE4 ayant une structure macrocyclique.

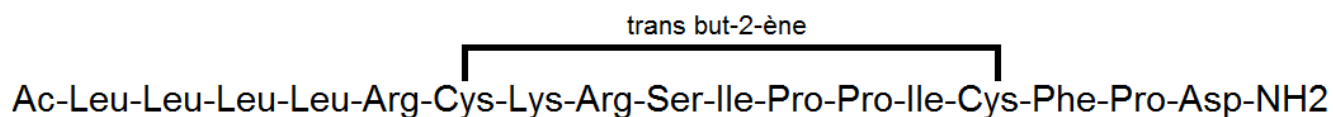


Figure 38. «Analogue macrocyclique #3» (4L-SFTI TB)

Tableau 5. Valeurs d'inhibition enzymatique et d'activité antiproliférative de l'analogue macrocyclique 4L-SFTI TB et C23

	K _i (nM)	IC ₅₀ DU145 (µM)	IC ₅₀ LNCaP (µM)
4L-SFTI TB	71,8	62	164
C23	4,9 ± 0,9	25 ± 10	40 ± 10

CHAPITRE 2 : IMPACTS DE LA SAR SUR LA PERMÉABILITÉ

2.1. Introduction

Dans le chapitre précédent, il a été question de nombreuses reprises de peptides ayant d'excellentes valeurs lors d'essais enzymatiques, mais n'ayant aucune activité antiproliférative dans le test MTT. Un bon exemple de cela est l'analogue 4-AMePhac 3ML. Ce dernier a une activité enzymatique picomolaire, mais aucune activité en cellule, tandis que l'analogue avec la même modification en N-terminal mais quatre leucines (4-AMePhac ML) a un K_i plus élevé, mais une valeur d' IC_{50} correcte en essai cellulaire. Nous n'avons aucun moyen de déterminer précisément ce qui était responsable de cette non-translation des valeurs enzymatiques chez les tests cellulaires et avons postulé qu'une absence de perméabilité chez ces analogues représentait une hypothèse logique pour l'expliquer.

Une des premières démonstrations probantes de cet effet a été faite via la synthèse d'une série d'analogues de C23 auquel les leucines étaient retranchées une à une. Les analogues produits, soit Ac-LLLRVK-Amba, Ac-LLRVK-Amba, Ac-LRVK-Amba et Ac-RVK-Amba, avaient pour objectif de réduire la taille de la molécule. En effet, les résultats ayant mené à la découverte du ML démontraient qu'à partir de trois leucines, le peptide avait une activité enzymatique appréciable (Tableau 6). Dans les faits, l'analogue Ac-LLLRVKR possédait une affinité et une sélectivité supérieure que le ML standard, la version à quatre leucines ayant été originellement sélectionnée sur le principe qu'une molécule plus grande pouvait être modifiables à plus de sites potentiels sans déstabiliser la pharmacodynamique.³⁸ Ces résultats ayant été produits avant l'ajout d'Amba en P1, nous nous sommes demandé dans la présente étude si le retrait de leucines pouvait être une option envisageable maintenant, surtout considérant que l'Amba aide considérablement à l'affinité de la molécule. Les résultats furent toutefois assez équivoques : bien que tous les analogues avec l'Amba en P1 possédaient une activité dans le bas nanomolaires (contrairement aux analogues sans l'Amba), seul l'analogue avec une leucine à chacune des positions P5 à P8 présentait une activité antiproliférative *in cellulo* (Figure 39) (Tableau 7).

Tableau 6. Inhibition enzymatique des inhibiteurs tronqués basés sur C23

P9	P8	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1	Ki (nM)
			Ac-	R	V	K	Amba		2,3 ± 0,2
			Ac-	L	R	V	K	Amba	1,4 ± 0,2
		Ac-	L	L	R	V	K	Amba	0,6 ± 0,1
	Ac-	L	L	L	R	V	K	Amba	0,11 ± 0,01
Ac-	L	L	L	L	R	V	K	Amba	3,1 ± 0,8

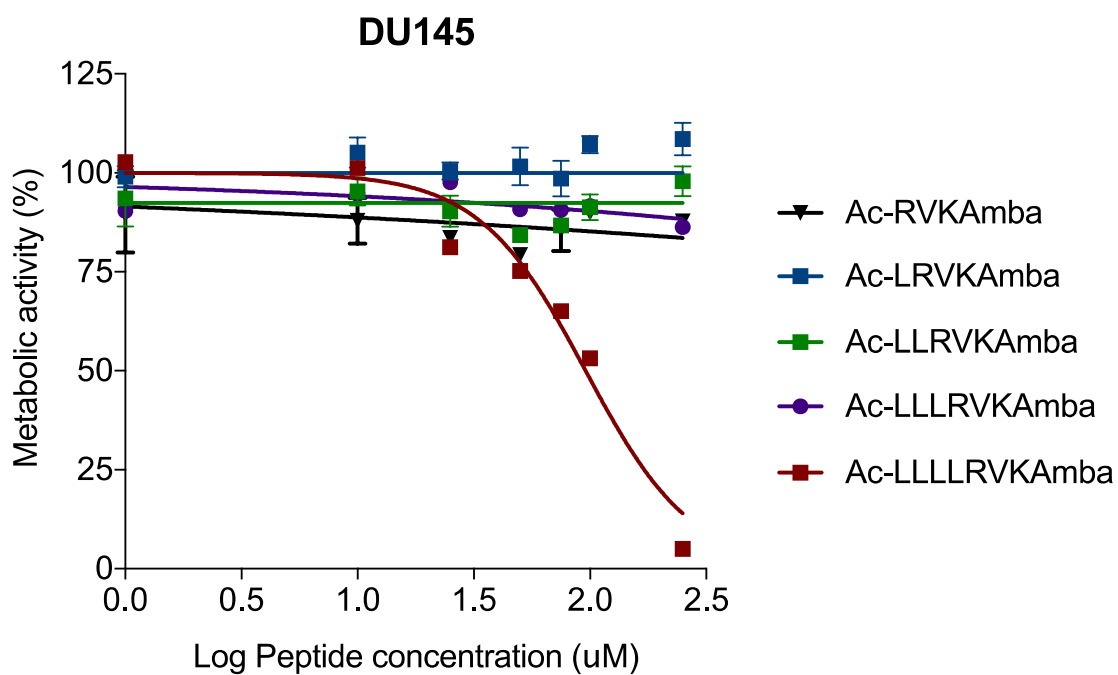


Figure 39. Courbes d'activité antiproliférative des analogues C23 tronqués

Tableau 7. Inhibition enzymatique et activité antiproliférative des inhibiteurs tronqués basés sur ML

P9	P8	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1	Ki (nM)	IC50 DU145 (µM)
			Ac-	R	V	K	R		1600 ± 400	N.C.
			Ac-	L	R	V	K	R	1600 ± 300	N.C.
		Ac-	L	L	R	V	K	R	240 ± 40	N.C.
	Ac-	L	L	L	R	V	K	R	18 ± 1	N.C.
Ac-	L	L	L	L	R	V	K	R	22 ± 6	100 ± 10

Afin de s'assurer que la perte d'activité *in cellulo* n'était pas imputable à la présence de la modification Amba, la série fut entièrement répétée sans la modification, soit une nouvelle synthèse des analogues Ac-LLLRVKR, Ac-LLRVKR, Ac-LRVKR et Ac-RVKR qui avaient été faits à l'époque dans les travaux de *Levesque et al.*, mais non testé *in cellulo*.³⁸ Les mêmes résultats furent observés, soit aucune activité antiproliférative sans la présence d'un résidu Leu en position P5 à P8. Ce sont ces résultats qui nous ont initialement menés à poser l'hypothèse qu'une faible perméabilité est associée à un manque d'hydrophobicité dans la section P5 à P8. ML et C23 sont tous deux des peptides très polaires, ayant trois résidus basiques en P1, P2 et P4 et il est connu qu'une trop haute polarité est souvent associée à une faible perméabilité. Nous n'avons toutefois aucun moyen concret de prouver cette hypothèse. Ce chapitre traitera de la méthodologie utilisée afin d'appuyer cette théorie.

2.2. Essai de perméabilité artificielle (PAMPA)

Plusieurs de nos peptides présentaient une bonne activité enzymatique *in vitro*, mais aucune en cellule et nous cherchions non seulement à savoir pourquoi, mais également à améliorer et accélérer notre processus de développement de médicament. Avec en tête que le problème était probablement causé par une faible perméabilité, l'idée d'utiliser l'essai PAMPA est venue. L'avantage principal de cette méthode est qu'il s'agit d'un processus à relativement haut débit et qui est surtout beaucoup plus rapide et beaucoup moins cher que la culture cellulaire.⁹³ Si nous étions capables de montrer hors de tout doute que l'inactivité en cellule était due au manque de perméabilité et que nous pouvions doser cette perméabilité par un essai haut débit, il serait alors inutile de tester les analogues répondant négativement au PAMPA en MTT, permettant ainsi d'économiser des ressources. L'objectif était donc de démontrer une corrélation entre l'absence de translation de données enzymatique en cellule avec la réponse dans les essais PAMPA.

L'essai PAMPA, pour Parallel Artificial Membrane Permeability Assay, est une méthode inspirée d'un essai de perméabilité cellulaire, l'essai Caco-2.^{94,95} Cette expérience utilise des cellules Caco-2, des cellules humaines d'adénocarcinome du côlon ayant des propriétés très similaires aux cellules de l'épithélium intestinal humain. Ces cellules sont ensemencées sur une membrane semi-perméable séparant deux puits, puis une fois arrivées à confluence, c'est-à-dire que la totalité de la surface est recouverte par les cellules, le composé médicamenteux est ajouté à l'un des deux puits (Figure 40). On dose ensuite le passage du composé d'un puits à l'autre, permettant ainsi de mesurer la perméabilité du composé. L'essai PAMPA se base sur le même principe, à la différence que la monocouche de cellule est substituée par une membrane lipidique artificielle cherchant à mimer la bicouche phospholipidique retrouvée chez les cellules.⁹⁶ Dans l'essai PAMPA, on mesure donc uniquement une perméabilité passive, alors que dans l'essai Caco-2 la perméabilité peut être passive ou médiée dans un sens ou dans l'autre par un transporteur. L'avantage que présente le PAMPA sur le Caco-2 est qu'il s'agit d'un test peu coûteux et rapide à faire. L'essai Caco-2 demande environ 21 jours de culture avant que la couche de cellule ne soit prête à être utilisée tandis que la couche de phospholipides utilisée en PAMPA est préparée et utilisable en moins de 10 minutes. Elle ne demande ni salle de culture ni personnel avec l'expertise nécessaire afin d'ensemencer des cellules d'adénocarcinome. Le principal avantage qu'à le Caco-2 par rapport au PAMPA est qu'il s'agit d'un essai beaucoup plus représentatif : comme il s'agit

de véritables cellules et non pas d'une membrane artificielle, les mécanismes de transport actif et d'efflux sont présents et sont mesurables.⁹⁷

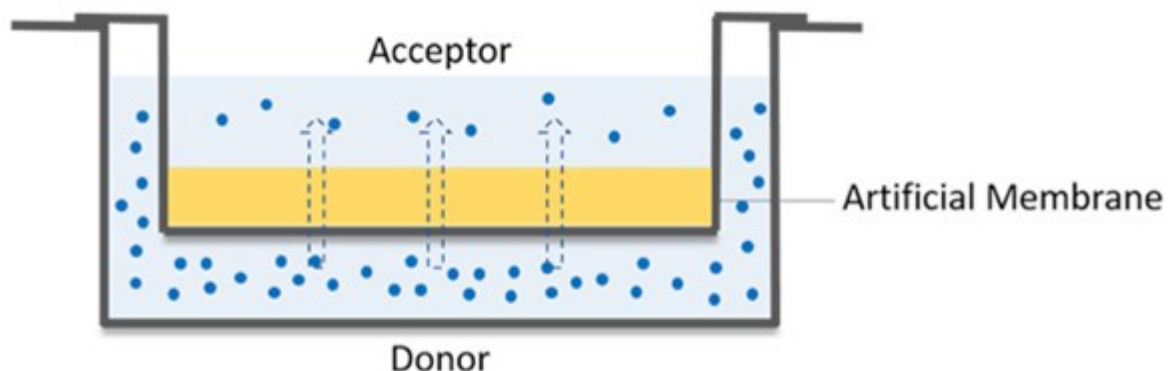


Figure 40. Représentation schématisé de l'essai PAMPA

La membrane de nos essais PAMPA était formée d'une solution 1% p/v de lécithine dans le dodécane, cette solution de phosphoglycéride ayant été démontrée comme étant apte à mimer la membrane cellulaire et à offrir une perméabilité très similaire aux essais de perméabilité cellulaires traditionnels.^{98,99} Afin de s'assurer que le reste de notre méthodologie était exacte, le vérapamil et le furosémide furent utilisés comme contrôle positif et négatif respectivement. Les autres variables de l'expérimentation furent la concentration du composé dans le puits accepteur, la durée de l'expérimentation ainsi que l'utilisation (ou non) d'un incubateur à 37°C muni d'une plaque rotatoire. Les paramètres constants quant à eux sont la quantité et la composition de la membrane utilisée, le volume de solvant dans les puits donneurs et accepteurs ainsi que la nature des composés testés, soit les contrôles vérapamil et furosémide et la série ML, Ac-LLLRVKR, Ac-LLRVKR, Ac-LRVKR et Ac-RVKR.

Pour le premier essai, nous avons tenté de doser le composé non pas en UPLC, mais en HPLC. Nous avons rapidement observé que la concentration initiale de 10 μ M était observable en HPLC, mais aucune trace du produit n'a été détectée dans les puits accepteurs. Considérant que le seul produit observé dans les puits accepteurs était le contrôle positif, nous avons conclu que la concentration d'inhibiteur dans les puits accepteurs était sûrement trop faible pour être dosée par HPLC. Par la suite, nous avons donc utilisé l'UPLC pour doser les résultats. Lors de notre deuxième tentative, une certaine

proportion de peptide fut observée dans les puits accepteurs, mais il était difficile de tirer des conclusions considérant les faibles concentrations et une certaine variabilité à l'intérieur du même triplicata. Les résultats retenus furent un ratio de «concentration dans puits donneur / concentration dans puits accepteur» de 32% pour le vérapamil (contrôle positif), de 1,4% pour le ML, de 0,2% chez le Ac-LLLRVKR et de moins de 0,0% chez les autres analogues. Bien que le ratio [accepteur]/[donneur] n'est pas une mesure généralement utilisée en mesure de perméabilité apparente, à cette étape d'optimisation de la méthode il s'agissait d'une mesure beaucoup plus facile et rapide à prendre afin d'évaluer la perméabilité relative entre les composés.

Nous avons effectué un troisième essai où la durée de l'expérimentation a été augmentée à 17h et la plaque incubée à 37°C sur une plaque rotatoire dans l'objectif d'obtenir une plus grande perméabilité. Bien que le ratio de concentration de vérapamil ait augmenté à 95%, soit un passage virtuellement complet, les ratios des autres peptides ont chuté à 0,23% pour le ML, à 0,09% pour le Ac-LLLRVKR et toujours 0% observé chez les autres, ce qui va à l'encontre de ce que nous nous attendions. Bien que les ratios relatifs observés fussent cohérents entre les différents analogues, à savoir une perméabilité croissant avec le nombre de leucines de l'analogue, il semblait difficile d'exercer un contrôle sur les valeurs absolues.

Nous avons plusieurs hypothèses sur la nature des problèmes à la source de cette observation. L'une d'entre elles est une évaporation du tampon phosphate. En effet, des perles de condensation avaient tendance à se former à l'intérieur de la plaque d'analyse, surtout pour la plaque à 37°C. Bien que ceci expliquerait une variance entre les puits, on s'attendrait que la plaque dans laquelle l'évaporation de solvant soit la plus grande, soit celle placée dans l'incubateur, ait une plus grande concentration de composé. Or, c'est l'inverse que l'on observe. Une autre hypothèse serait une co-précipitation du composé avec le standard interne. Il a été observé que les niveaux de peptide et de standard interne avaient tendance à chuter au cours de l'analyse, ce qui n'était pas normal. Cette hypothèse apparut de plus en plus crédible lorsque des essais furent faits en parallèle avec plusieurs échantillons du même composé. Il fut observé que l'aire sous la courbe dosée au UPLC était très variable selon la source de la solution à tester. Ainsi une solution fraîche a été comparée à une solution laissée à incuber quelques heures à 37°C et une autre préparée une journée à l'avance et laissée au congélateur toute la nuit. Des différences majeures ont été observées. En fonction de ces résultats, nous avons supposé qu'il était

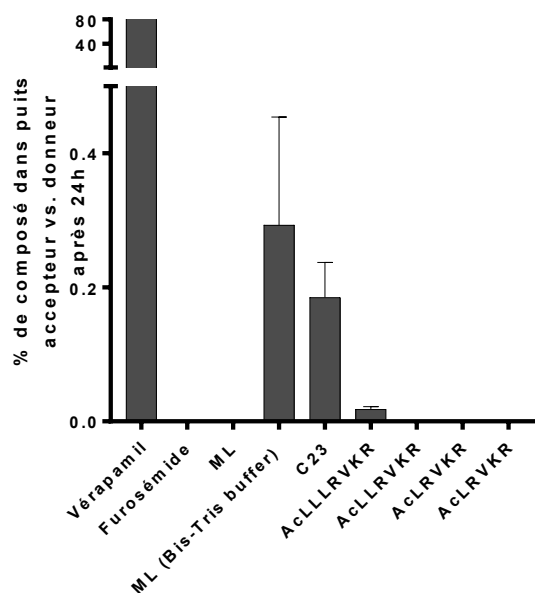


Figure 41. Histogramme des valeurs obtenues dans un essai PAMPA

possible qu'une précipitation des analogues se fasse dans le solvant choisi à basse température. Il était donc possible que le solvant utilisé, une solution H₂O + 1% DMSO, ne soit pas adapté au peptide dans le cadre de cet essai. Nous avons donc effectué un nouvel essai avec des solutions de peptides préparés fraîchement. Nous avons également ajouté deux nouvelles solutions de peptides contrôles, soit le ML dans un tampon Bis-Tris (Bis-Tris 20 mM pH 6,5, CaCl₂ et BSA 1,8 mg/mL) et le C23 dans le tampon H₂O + 1% DMSO, afin de pouvoir comparer les résultats. Ce que nous avons observé est une perméabilité supérieure marquée chez le ML avec le tampon Bis-Tris versus l'échantillon ML en tampon H₂O qui n'a pas du tout passé la membrane, résultat ne concordant pas avec ce qui avait été observé précédemment pour ces peptides (Figure 41). Voyant que l'utilisation d'un tampon différent semblait améliorer les valeurs de perméabilité absolue, nous avons décidé de tester à nouveau, mais en utilisant le tampon Bis-Tris, espérant ainsi pouvoir plus facilement discriminer les composés de plus haute perméabilité de ceux de plus faible perméabilité. Nous fûmes toutefois désolés de constater que le C23 et tous les autres peptides à l'exception du ML ne démontraient aucune perméabilité avec le tampon Bis-Tris. Nous avons testé dans les mêmes conditions à nouveau afin de valider ces résultats, et des résultats semblables furent obtenus.

Ces nombreuses tentatives ont finalement montré que nos composés peptidiques ont une perméabilité excessivement faible et que la méthodologie d'essai PAMPA n'est pas capable de discriminer efficacement les analogues de perméabilité minimale, mais suffisante pour avoir une activité *in cellulo*, des analogues n'ayant pas cette perméabilité suffisante. En revanche, elle semble pouvoir être utilisée afin de doser la perméabilité relative entre deux inhibiteurs du même type. Toutefois, l'importante variabilité observée de plaque en plaque et les très faibles niveaux de perméabilité observés chez l'entièreté de nos analogues sont des obstacles importants qui s'avèrent toujours problématiques, et ce même après plusieurs tentatives d'optimisation. Une autre théorie serait que ML et C23 soient intégrés dans la cellule par transport actif, mais ceci est une hypothèse à première vue assez improbable, surtout considérant qu'une corrélation assez marquée est observable entre l'hydrophobicité en P5 à P8 et l'inhibition de la croissance cellulaire. La théorie du transport actif ne saurait expliquer ce résultat, sauf l'affinité du transporteur pour nos analogues était relié à l'hydrophobicité de leur section P5 à P8. Quoiqu'il en soit, la conclusion générale à tirer de cette série d'expérimentations est que l'essai PAMPA n'est pas une méthode d'analyse de perméabilité haut débit adaptée pour notre classe d'inhibiteurs.

2.3. Analyse par cytométrie de flux (FACS)

L'utilisation de l'essai PAMPA ayant illustré certaines tendances, mais avec beaucoup de variabilité entre les résultats, nous nous sommes tournés vers une manière alternative pour prouver que la perméabilité était en cause dans l'absence de résultats *in cellulo*. La méthode que nous avons utilisée est l'ajout d'un groupement FITC (Fluorescéine isothiocyanate) au peptide afin de pouvoir doser son absorption par expérience de cytométrie de flux FACS (Fluorescence-activated cell sorting). Le principe de l'expérience est simple : la série C23 et ses analogues avec moins de leucines furent synthétisés, avec la différence que le FITC fut couplé en N-terminal au lieu de l'acétyle. Une fois le peptide achevé, il fut incubé avec les cellules et dosé dans une expérimentation triant les cellules selon leur signal fluorescent, soit l'expérience FACS, la force de ce signal étant proportionnelle à l'absorption de l'analogue fluorescent au sein de la cellule.¹⁰⁰

Cette technique comporte évidemment certaines limitations, dont les plus évidentes sont les deux suivantes. En premier lieu, la synthèse d'un analogue comportant FITC peut constituer un défi plus grand que la synthèse d'un analogue standard. Bien que la majorité des peptides se prêtent relativement

facilement à cet ajout, d'autres types de composés peuvent ne pas être adaptés au FITC. De plus, certaines précautions doivent être prises afin d'éviter le photoblanchiment du composé lors de la synthèse, le photoblanchiment étant une perte de fluorescence associée au bris de liaisons ou réarrangements non-désirés du composé lorsqu'il est exposé à la lumière. En second lieu, il est évident que l'ajout d'un groupement FITC modifie considérablement la structure et les propriétés physico-chimiques de la molécule. Le FITC en soi est relativement hydrophobe et on pourrait s'imaginer que ceci améliore la perméabilité de l'analogue auquel il est greffé, faussant ainsi ces résultats à la hausse. Les cLogP démontrent d'ailleurs cette différence d'hydrophobicité marquée (Tableau 8).¹⁰¹ Cette différence devrait cependant être similaire d'un composé à l'autre, permettant tout de même de comparer les composés entre eux. En l'absence de meilleure alternative, c'est l'option que nous avons choisie.

Tableau 8. cLogP des analogues FITC versus les analogues correspondant, sans FITC

Analogue	cLogP
Ac-RVK-Amba	-3,1
Ac-LRVK-Amba	-2,35
Ac-2LRVK-Amba	-1,61
Ac-3LRVK-Amba	-0,86
FITC-0L	0,12
FITC-1L	0,87
FITC-2L	1,61
FITC-3L	2,36

L'isothiocyanate, fluorescent ou non, participe à la dégradation d'Edman chez les peptides. Cette réaction d'élimination aura pour effet de cliver les acides aminés du peptide à partir de leur extrémité N-terminale (Figure 42). Afin d'éviter que cette réaction ne se produise, nous avons dû ajouter une bêta alanine en N-terminal, la dégradation d'Edman étant impossible chez les acides aminés bêta.¹⁰² L'analogue que nous avons synthétisé avait donc la structure FITC-[betaAla]-dLLLLRVK-Amba et ses quatre dérivés ayant trois, deux, une ou aucune leucine. Il est à noter que nous avons opté pour l'utilisation de la L-leucine en P8, bien que le peptide C23 ait une D-leucine à cette position. Nous cherchions à illustrer que l'effet observé était directement lié au nombre de leucine et l'ajout d'une isomérisation différente en P8 aurait pu mener à une interprétation différente que nous cherchions à éviter.

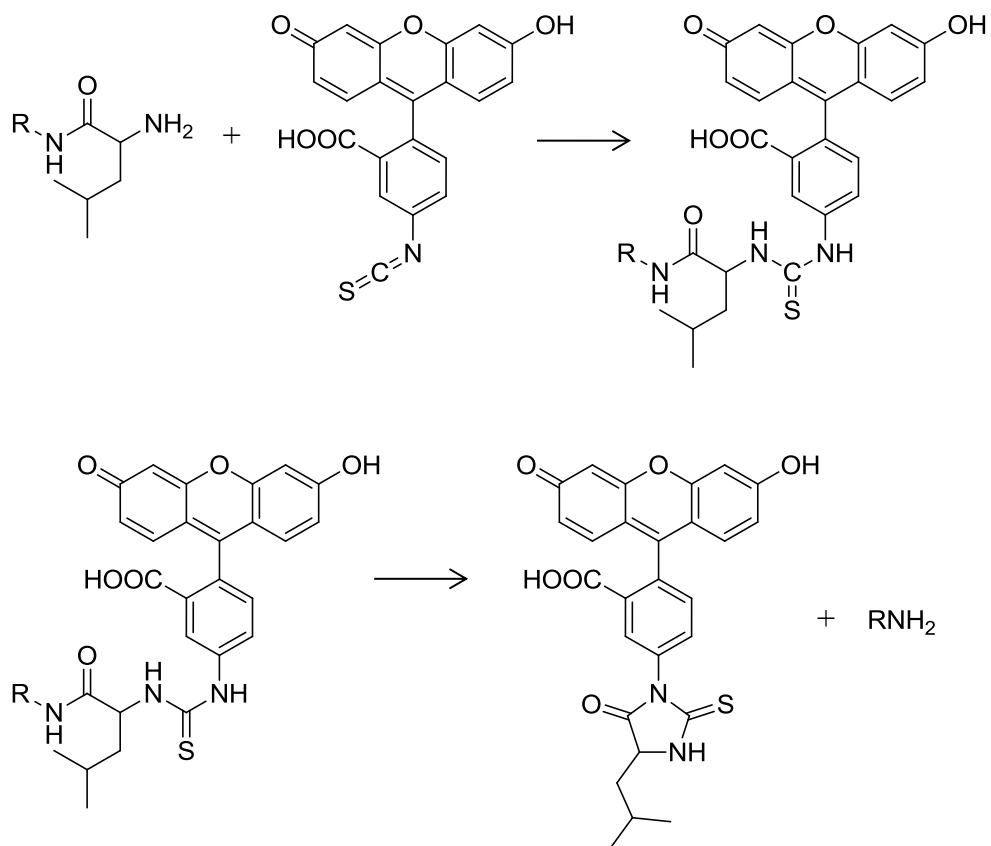


Figure 42. Réaction de couplage avec FITC suivie de dégradation d'Edman sur un acide alpha-aminé

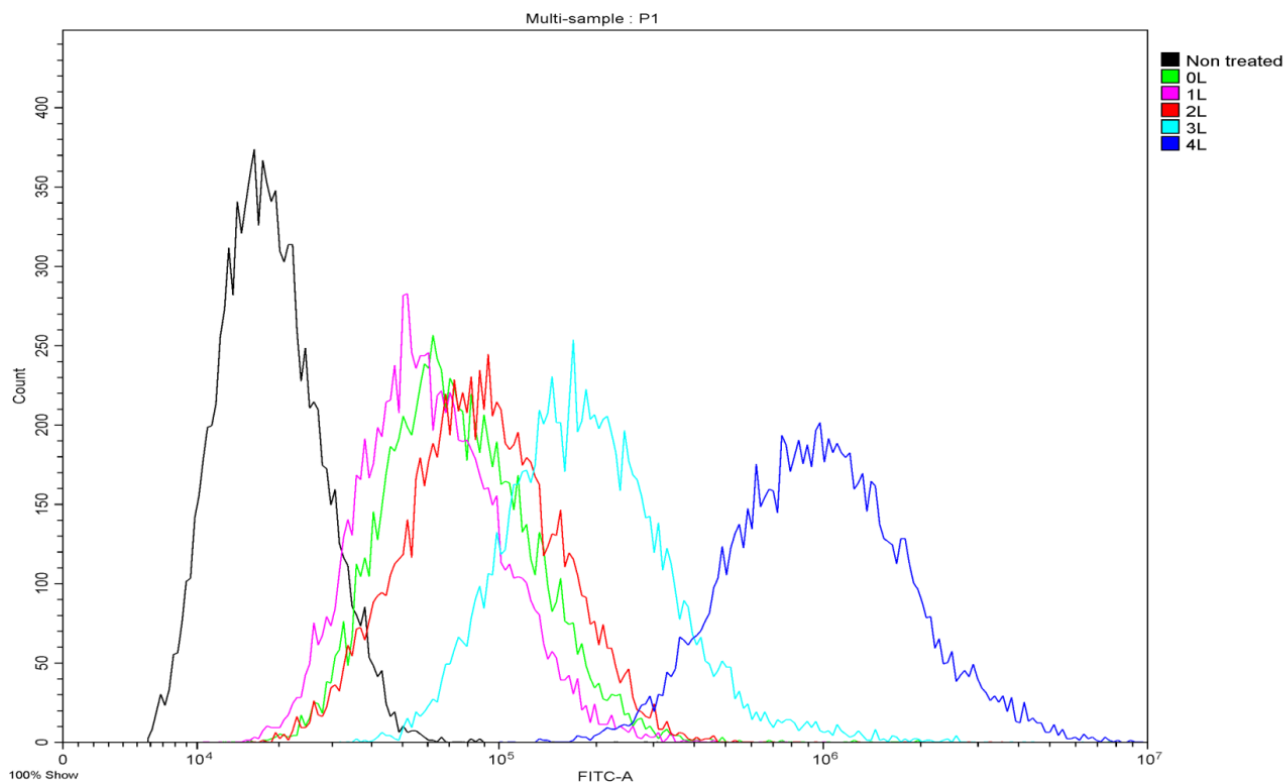


Figure 43. Résultats d'expérience de cytométrie de flux de ML-FITC et analogues tronqués

Les résultats de cytométrie de flux sont assez équivoques, illustrant nettement une hausse de l'absorption de l'analogue fluorescent corrélé avec le nombre de leucines (Figure 43). On observe chez les analogues comportant zéro ou une leucine des niveaux de fluorescence supérieurs au contrôle, mais somme toute faibles, indiquant une faible perméabilité du produit. Cette perméabilité augmente progressivement avec l'ajout de leucines pour atteindre un maximum pour l'analogue fluorescent à quatre leucines. Ceci prouve notre hypothèse que la présence d'un acide aminé en P8 est essentielle à la perméabilité des analogues.

En conclusion, la perméabilité de cette série de peptides, facteur qui pourrait être facile de négliger, est en réalité un paramètre important à prendre en compte lors de la synthèse des analogues. Les mécanismes derrière les analogues perméables et non perméables restent toutefois peu clairs. Nous savons hors de tout doute que la présence d'un acide aminé en P8 est nécessaire, mais les raisons sous-jacentes ne sont pas évidentes. Bien que les résultats précédents suggèrent que l'hydrophobicité du résidu à cette position est corrélé avec la présence ou l'absence d'activité *in cellulose*, il est bien possible que cette activité variable ne soit pas seulement dépendante d'une variation de LogP. L'ajout ou le retrait d'un méthyle n'a pas d'incidence marquée sur le LogP d'une molécule, or nous avons vu que ce méthyle peut être la différence entre un analogue efficace *in cellulose* et un analogue inefficace.

Une théorie que nous avons à ce sujet repose sur la conformation que prend l'inhibiteur dans un milieu hydrophile versus hydrophobe. On sait que les macrocycles, par exemple, sont capables d'adopter de multiples conformations différentes selon leur milieu et que ceci affecte leur perméabilité.¹⁰³ Ceci étant dit, les peptides que nous étudions ne sont pas des macrocycles, mais ils sont relativement volumineux et flexibles. Ayant une section clairement hydrophile et une section clairement hydrophobe, il ne serait pas impossible qu'ils soient capables de replier leur section hydrophobe par-dessus l'autre afin de camoufler leurs sections polaires lors du passage de la membrane cellulaire. Vu ce caractère amphiphile de C23 et de ses analogues, on pourrait également imaginer la formation de micelles permettant la perméabilité du peptide. Malheureusement, ces théories de structure tridimensionnelles du peptide restent difficiles à démontrer et les études PAMPA ou de cytométrie de flux ne sont pas aptes à jauger ce genre de paramètres. Une façon de le faire serait via des études informatiques de dynamique moléculaire ou mieux encore via des études de résonance magnétique nucléaire dans des milieux spécifiques. Si nous étions capables de corréler des résultats de résonance magnétique nucléaire avec

des résultats de dynamique moléculaire, il pourrait être très intéressant de développer un logiciel permettant de déterminer à l'avance la perméabilité ou non d'un certain type d'analogue. Par exemple, si les études de RMN démontrent clairement qu'une interaction électrostatique particulière est observée chez les analogues perméables, mais pas chez ceux imperméables, nous pourrions conclure qu'il est probable que cette interaction particulière soit essentielle à la perméabilité. Ce modèle prédictif nous permettrait de tester les analogues *in silico* au préalable et ainsi d'investir notre temps et nos ressources dans la synthèse d'analogues ayant plus de chances d'être efficaces. Il y a donc encore beaucoup d'études qui devront être réalisées afin d'élucider les raisons exactes derrière la perméabilité des analogues de C23.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le cancer de la prostate est une maladie prévalente contre laquelle les traitements actuels comportent certaines lacunes au niveau de l'efficacité, ou sont associés à des effets secondaires limitants. La chimiothérapie et la radiothérapie ne sont pas exemptes de toxicité importante et la thérapie anti-androgénique, traitement de premier choix, a la limitation d'être inefficace lorsque le cancer atteint un stade avancé indépendant des hormones. Ces raisons justifient largement la recherche d'alternatives ciblées pour cette maladie. Les travaux de notre laboratoire ont identifié qu'une enzyme, la proprotéine convertase PACE4, est sélectivement surexprimée en cas de cancer de la prostate et que son inhibition permet de stopper la prolifération cancéreuse. L'inhibiteur peptidique ML a été développé à cette fin, suivi par un analogue peptidomimétique plus stable, le C23, ce dernier allant devenir la tête de série d'études de structure-activité subséquentes.

Afin d'améliorer le principal paramètre pharmacocinétique déficient de C23, soit la stabilité métabolique, nous avons produit plusieurs analogues peptidomimétiques de cette tête de série. Nous avons modifié l'inhibiteur de façon rigoureuse et systématique, changeant les positions P1, P2, P3 et la section N-terminale du peptide. Bien que les modifications en P1 n'aient offert aucun gain de perméabilité et que celles en P2 étaient associées à une perte d'activité antiproliférative, l'analogue DTle ML modifié en P3 a démontré une stabilité plasmatique plus élevée, une amélioration d'un facteur 5,2. Les modifications acide aminométhylphénylacétique et acide aminophénylacétique en position N-terminale P9 ont également été associées à une hausse de stabilité. En combinant ces modifications avec d'autres préalablement identifiés, nous avons produit une série de huit analogues de C23 possédant une activité antiproliférative égale ou supérieure en plus d'avoir une stabilité oscillant entre 8 et 12 heures, soit une amélioration considérable par rapport à notre tête de série. Nous avons ainsi confirmé notre hypothèse de recherche, à savoir qu'il était possible de produire des analogues de cette tête de série possédant une stabilité supérieure sans affecter l'efficacité du composé. Nous avons également exploré l'avenue macrocyclique comme moyen d'augmenter la stabilité de C23, obtenant un analogue légèrement plus stable ($t_{1/2} = 2,9$ h), mais moins que via l'approche bioisostérique. Nos recherches ont aussi permis d'illustrer le premier analogue SFTI-1 ayant une activité *in cellulo*, démontrant la

possibilité d'utiliser la greffe intrapeptidique comme moyen d'optimiser la stabilité au-delà du contexte *in vitro*.

Lors de nos efforts afin d'améliorer la stabilité du composé, des problèmes d'absence de translation de données enzymatiques en efficacité cellulaire devinrent évidents. L'hypothèse la plus plausible semblait être un problème de perméabilité. Afin de nous munir d'une méthode à haut débit permettant de départager les analogues perméables des non perméables, nous avons tenté d'établir un protocole d'essai PAMPA. Considérant la faible perméabilité de ces analogues et le manque de reproductibilité des résultats, nous avons opté avec succès pour l'utilisation d'analogues marqués au FITC afin de démontrer les problèmes de perméabilité, laissant tomber l'idée d'un test de perméabilité haut débit. Établir plus clairement les causes derrière la perte de perméabilité de certains analogues par rapport à d'autres nous permettrait d'accélérer les études de structure-activité à venir et il s'agit donc de pistes de recherches intéressantes pour l'avenir.

Finalement, des recherches sur la PACE4 effectuées en parallèle de notre propre étude de relation structure-activité mettent en lumière des comportements de la PACE4 qu'il serait possible d'exploiter dans le futur. Effectivement, une modification post-traductionnelle de la PACE4 est à l'origine d'une forme alternative de l'enzyme, démontrée comme étant l'isoforme responsable de la prolifération tumorale.⁴² Cette PACE4 alternative est aussi surexprimée dans d'autres types de cancers, notamment celui du poumon, du pancréas et de la thyroïde. En réorientant notre étude de structure-activité spécifiquement contre cette isoforme, il serait sans doute possible d'améliorer les pronostics de traitement de notre inhibiteur. En développant un inhibiteur spécifique, il serait envisageable d'élargir le spectre de traitement de celui-ci à bien plus que le cancer de la prostate, valorisant considérablement la portée de cette étude de structure-activité.

RÉFÉRENCES ET NOTES

- ¹ Cutler, D. M. et E. Meara. 2001. *Changes in the Age Distribution of Mortality over the 20th Century*, NBER Working Paper Series, no 8556, Cambridge, Massachusetts, National Bureau of Economic Results.
- ² Nagunar, D. 1986. Longévité et tables de mortalité chronologiques (abrégées), 1921-1981, Canada et provinces, produit no 89-506-XPB au catalogue de Statistique Canada.
- ³ Jones, D.S.; Podolsky S.H.; Greene J.A. *N. Engl. J. Med.* **2012**, 366, 2333-2338.
- ⁴ Ferlay J.; Soerjomataram I.; Ervik M.; Dikshit R.; Eser S.; Mathers C et al. *Int. J. Cancer.* **2012**, 136, 359-386.
- ⁵ Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics. 2017. *Canadian Cancer Statistics 2017*. Toronto, ON: Canadian Cancer Society.
- ⁶ Statistique Canada. 2012. *Table 102-0561 - Leading Causes of Death, Total Population, by Age Group and Sex, Canada, Annual*. Ottawa: Statistics Canada. CANSIM database.
- ⁷ American Society of Clinical Oncology. 2015. *What is Cancer?*, <http://www.cancer.net/navigating-cancer-care/cancer-basics/what-cancer> (Site consulté le 12 mai 2018).
- ⁸ *Biologie*, Campbell N.A. et J.B. Reece. 3ème édition, ERPI (Pearson) : St-Laurent, Québec, 2007, 1334 pages.
- ⁹ Tomasetti, C. et B. Vogelstein. *Science.* **2015**, 347, 78-81
- ¹⁰ *DNA Damage, DNA Repair and Cancer*. Bernstein C.; Prasad A.R.; Nfonsam V.; Bernstein H. **2013**, 413-65.
- ¹¹ Hanahan, D. et R.A. Weinberg. *Cell.* **2000**, 100, 57-70.
- ¹² *Biologie moléculaire du gène*, Watson, J, et al. 6ème édition, Pearson : Paris, France, 2009, 688 pages.
- ¹³ Kaji, E.H.; Leiden, J.M. *JAMA.* **2001**, 285.
- ¹⁴ Nishimasu, H. et al. *Cell.* **2014**, 156, 935-949.
- ¹⁵ Paine, P.; Moore, L.; Horowitz, S. *Nature.* **1975**, 254, 109-114.
- ¹⁶ *Cancer Nursing: Principles and Practice*. Gillespie, T.N.; Yarbrow, C.H.; Wujcicki D.; Holmes Gobel B. 7ème édition. Jones and Barlett : Sudbury, MA, 2011, 1879 pages.
- ¹⁷ Hertel, L.W. et al. *Cancer Research.* **1990**, 50, 4417-4422.

- ¹⁸ *General principles of radiation oncology*, Kun, L.E.; Pizzo, P.A.; Poplack, D.G. 6ème édition. Williams & Wilkins : Philadelphia, Lippincott, 2011, 1321 pages.
- ¹⁹ *Principles of Radiation Therapy*, Camphausen, K.A.; Lawrence, R.C.; Pazdur, R.; Wagman L.D.; Hoskins, W.J. 11ème édition. Cancer Network, 2008.
- ²⁰ *Pharmacology*, Rang, H.P.; Dale, M.M. 6ème édition. Churchill Livingstone : Philadelphia, USA, 2007, 777 pages.
- ²¹ Jänne, P.A.; Gray, N.; Settleman, J. *Nature Reviews Drug Discovery*. **2009**, 8, 709-723.
- ²² Verma, S. et al. *N. Engl. J. Med.* **2012**, 367, 1783-1791.
- ²³ Société canadienne du Cancer. 2017. *Statistiques sur le cancer de la prostate*, <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/prostate/statistics/> (Site consulté le 14 mai 2018).
- ²⁴ NIH : National Cancer Institute. 2018. *Prostate Cancer Treatment*, https://www.cancer.gov/types/prostate/patient/prostate-treatment-pdq#section/_142 (Site consulté le 14 mai 2018).
- ²⁵ Perlmutter, M.A.; Lepor, H. *Rev. Urol.* **2007**, 9, S3–8.
- ²⁶ Tan, M. E.; Li, J.; Xu, H. E.; Melcher, K.; Yong, E.L. *Acta Pharmacologica Sinica*, **2014**, 36, 3–23.
- ²⁷ Feldman, B. J.; Feldman, D. *Nature Reviews Cancer*. **2001**, 1, 35-45.
- ²⁸ Artenstein, A.W.; Opal, S.M. *N. Engl. J. Med.* **2011**, 365, 2507-2518.
- ²⁹ *Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics*, Goodman, L.S.; Brunton, L.; Chabner, B.; Knollmann, B.C. McGraw-Hill : New-York. 2011. 2084 pages.
- ³⁰ Seidah, N.G.; Chrétien, M. *Brain. Res.* **1999**, 848, 45-62.
- ³¹ Fugère, M. Day, R. *Trends. Pharmacol. Sci.* **2005**, 26, 294-301.
- ³² Hosaka, M.; Nagahama, M.; Kim, W.S.; Watanabe, T.; Hatsuzawa, K.; Ikemizu, J.; Murakami, K.; Nakayama, K. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 12127–12130.
- ³³ Khatib, A.M.; Siegfried, G.; Chrétien, M.; Metrakos, P.; Seidah, N.G. *Am. J. Pathol.* **2002**, 160, 1921-1935.
- ³⁴ Weinreich, M.; Frishman, W.H.; *Cardiology in Review*. **2014**, 22, 140-146.
- ³⁵ Seidah, N.G. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2003**, 100, 928-933.
- ³⁶ Amgen. 2014. *Amgen – Investors*. <http://investors.amgen.com/phoenix.zhtml?c=61656&p=RssLanding&cat=news&id=1961786> (Site consulté le 18 mai 2018).

- ³⁷ D'Anjou, F. et al. *Transl. Oncol.* **2011**, 4, 157-172.
- ³⁸ Levesque, C. et al. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 10501-10511
- ³⁹ The Balance. 2018. *Top 20 Blockbuster Cancer Drugs*. <https://www.thebalance.com/top-cancer-drugs-2663234> (Site consulté le 21 mai 2018).
- ⁴⁰ Weiss W.A. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3, 739-44.
- ⁴¹ Chames, P.; Van Regenmortel, M.; Weiss, E.; Baty, D. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, 157, 220-233.
- ⁴² Couture, F et al. 2017. *Cancer Res.* **2017**, 77, 6863-6879
- ⁴³ Fischer, P.M. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2003**, 4, 339–356.
- ⁴⁴ Wagner, J.; Q, Hongchang.; Hruby, V.J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12, 292–296.
- ⁴⁵ Gibbs, A.C.; Bjorndahl, T.C.; Hodges, R.S.; Wishart, D.S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 1203-13.
- ⁴⁶ Laufer, B.; Chatterjee, J.; Frank, A.O.; Kessler, H.; *Journal of Peptide Science.* **2008**.
- ⁴⁷ T.K. Sawyer. *Comprehensive Medicinal Chemistry II.* **2007**.
- ⁴⁸ Bohacek, R.S.; McMartin, C.; Guida, W.C.; *Med. Res. Rev.* **1996**, 16, 3-50.
- ⁴⁹ Wermuth, C.G.; Ganellin, C.R; Lindberg, P; Mitscher, L.A.; *Pure and Applied Chemistry.* **1998**, 70, 1129–1143
- ⁵⁰ Meanwell, N.A. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 2529–2591.
- ⁵¹ Allen, F.H. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, 52, 857–866.
- ⁵² *Absorption and Drug Development*. Avdeef, A. Wiley-Interscience/J. Wiley. : Hoboken, N.J. 2003.
- ⁵³ Kesisoglou, F.; Panmai, S.; Wu, Y. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, 59, 631– 644.
- ⁵⁴ Kwon, Y. *Handbook of Essential Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Metabolism for Industrial Scientists*. Kluwer Academic/Plenum Publishers : New York. 2001.
- ⁵⁵ Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 46, 3–26.
- ⁵⁶ Hann, M.M; Keserü, G.M. *Nature Reviews Drug Discovery.* **2012**, 11, 355–365.
- ⁵⁷ Katrin, P.; Stenberg, P.; Luthman, K.; Artursson, P. *Pharmaceutical Research.* **1997**. 14, 568–571.
- ⁵⁸ Pajouhesh, H.; Lenz, G.R.; *NeuroRx.* **2005**, 2, 541–553.
- ⁵⁹ Veber et al. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2615–2623.
- ⁶⁰ Craik, D.J.; Fairlie, D.P.; Liras, S.; Price, D. *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, 81, 136-47.
- ⁶¹ Kazius, J.; McGuire, R.; Bursi, R. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 312–320.
- ⁶² ICH. 2018. *Safety Guidelines ICH*. <http://www.ich.org/products/guidelines/safety/article/safety-guidelines.html> (Site consulté le 22 mai 2018).
- ⁶³ Corzo, J. *Biochem Mol Biol Educ.* **2006**, 34, 413–416.

- ⁶⁴ Cheng, Y.; Prusoff, W.H. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, 22, 3099–3108.
- ⁶⁵ Mosmann, T. *Journal of Immunological Methods.* **1983**, 65, 55–63.
- ⁶⁶ Wikipedia.org. 2014. *MTT Assay*. https://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay (Crédit photo) (Site consulté le 27 mai 2018).
- ⁶⁷ Kwiatkowska, A. et al. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 98–109.
- ⁶⁸ Levesque, C. et al. *Oncotarget.* **2015**, 6, 3680-3693.
- ⁶⁹ Leiros, H-K. S. et al. *Protein Science.* **2004**, 13, 1056–1070.
- ⁷⁰ Beaudreau, J-L.; Dory, Y.; Gendron, L. Travaux non publiés.
- ⁷¹ Manuel E. Than, « *PACE4 homology model* ».
- ⁷² Nguyen, D. et al. *Tetrahedron.* **1981**, 37, 4229–4238.
- ⁷³ Dianati, V. et al. *ChemMedChem.* **2017**, 12, 1169–1172.
- ⁷⁴ Hardes et al. *ChemMedChem.* **2015**, 10, 1218–1231.
- ⁷⁵ Ghosh, D. et al. *Chem Sci.* **2016**, 7, 5212–5218.
- ⁷⁶ Couture, F et al. *Biomol Concepts.* **2011**, 2, 421–438.
- ⁷⁷ Kwiatkowska, A. et al. Travaux non publiés.
- ⁷⁸ Bissantz, C. et al. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 5061–5084.
- ⁷⁹ Marsault, E. & M. L. Peterson. *J Med Chem.* **2011**. 54, 1961-2004
- ⁸⁰ Bockus, A. et al. *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, 13, 821–836.
- ⁸¹ Giordanetto, F.; Kihlberg, J. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 278-295
- ⁸² *History of the Discovery and Development of Cyclosporine (Sandimmune®)*, Borel, J.F.; Kis, Z.L.; Beveridge, T.; Merluzzi, V.J.; Adams, J. Birkhäuser : Boston. 1995.
- ⁸³ Wikipedia.org. 2018. *Ciclosporin*. <https://en.wikipedia.org/wiki/Ciclosporin> (Crédit photo) (Site consulté le 1 juin 2018).
- ⁸⁴ Shaw, A. et al. *N Engl J Med.* **2016**, 374, 54-61
- ⁸⁵ Sahu, A. et al. *South Asian J. Cancer.* **2013**, 2, 91–97.
- ⁸⁶ Lepek, T. et al. *Eur. J. Cell Biol.* **2017**, 96, 476-485.
- ⁸⁷ Wang, C.K. et al. *Eur. J. Cell Biol.* **2016**, 109, 342-349.
- ⁸⁸ Tao, H. et al. *FEBS Journal.* **2006**, 273, 3907–3914.
- ⁸⁹ Jiang, S. et al. *Org. Lett.* **2007**, 9, 9-12.
- ⁹⁰ Lesner, A. et al. *Peptide Science.* **2013**, 102, 124-135.
- ⁹¹ Fittler, H. et al. *ChemBioChem.* **2015**, 16, 2441 – 2444.

- ⁹² Arunachalam et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2000**, 97, 745–750.
- ⁹³ Avdeef, A. et al. *Pharm. Sci.* **2005**, 24, 333-349.
- ⁹⁴ Ottaviani, G. et al. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 3948–3954.
- ⁹⁵ Fogh J. & G. Trempe. *Human Tumor Cells In Vitro*. J. Fogh, ed. : Plenum, 1975, p. 115-141.
- ⁹⁶ Artursson, P.; Karlsson, J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 175, 880-885.
- ⁹⁷ Van Breemen R.B.; Li, Y. *Expert Opinion. Drug Metab. Toxicol.* **2005**, 1, 175-185.
- ⁹⁸ Bermejo, M. et al. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, 21, 429-441.
- ⁹⁹ Avdeef, A et al. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, 24, 333-349.
- ¹⁰⁰ Roederer, M. *Cytometry*. **2001**, 45, 194-205.
- ¹⁰¹ cLogP calculés via le logiciel Molinspiration (Site consulté le 14 février 2019).
- ¹⁰² Jullian, M. et al. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 260-263.
- ¹⁰³ Whitty, A. et al. *Drug Discov Today*. **2016**, 21, 712-717.

ANNEXE 1 : PARTIE EXPÉRIMENTALE

Remarques générales

Les solvants qui ont été utilisés dans les réactions de couplage peptidique sont le dichlorométhane anhydre (Fisher) et/ou le N,N-diméthylformamide anhydre (Alfa Aesar). Pour les lavages de résine, le dichlorométhane, le N,N-diméthylformamide (Fisher) et le méthanol (Fisher) ont été utilisés. Les peptides portant le résidu Amba en position C terminal ont été synthétisés sur résine chloro 2-chlorotriyle et les autres peptides sur résine TentaGel S RAM (Rapp Polymere).

Les analogues peptidiques ont été purifiés sur un appareil HPLC préparatif (Waters Sample Manager 2767, Binary gradient module 2545, SQ Detector 2) équipé d'une colonne XSelect Peptide CSH C18 OBD Prep 92 (100 x 19 mm, 5 μ m) avec un débit de 20 mL/min pendant 60 minutes dans des gradients variables (selon le peptide) acétonitrile dans H₂O + 0,1% acide trifluoroacétique ou sur un appareil HPLC semi-préparatif (Agilent 1100 series HPLC) équipé d'une colonne Agilent C18, 15 μ m, 100 Å, (7,8 mm x 300 mm) avec un débit, une durée et un gradient ACN + 0,1% TFA dans H₂O + 0,1% TFA variables selon le peptide à purifier. La pureté des composés testés est au minimum de 95%, dosé par HPLC UV.

Les suivis de réactions et spectres UV (essai PAMPA) ont été enregistrés sur UPLC/MS « Acquity H-Class UPLCMS » Waters (Colonne BEH C18, 50 x 2,1 mm, 1,7 μ m) avec un débit de 0,8 mL/min sur 2,5 minutes dans un gradient de 5 à 95% ACN dans H₂O, tous deux tamponnés avec 0,1% d'acide formique.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ¹H furent enregistrés sur Bruker Ascend 400 en utilisant le signal résiduel du d₆-DMSO (2,49 ppm) comme étalon interne. Les spectres de masse ont été enregistrés sur un appareil qTOF 5600 (AB Sciex).

Méthode générale pour la synthèse peptidique sur phase solide

Chargement de la résine Chlorure de 2-chlorotriyle (2-CTC) :

La résine a été placée dans un réacteur de propylène muni d'un filtre en teflon (Fisher). Puis ont été ajoutés 1,2 équivalents (eq.) d'acide aminé et 4,8 eq. de DIPEA dissout dans le DCM. La suspension a

été agitée sur une plaque rotatoire pendant 2h30, puis a été lavée avec DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1 v/v/v) (x3), DCM (x3), DMF (x3) puis DCM (x3) afin de bloquer les sites n'ayant pas réagi. La résine a été laissée à sécher à l'air O/N puis le chargement approximatif a été quantifié par pesée.

Chargement de la résine TentaGel S RAM :

La résine a été placée dans un réacteur de plastique avec 3 eq. d'acide aminé, 3 eq. de PyBOP ou HATU, 3 eq. de 6 Cl-HOBt et 9 eq. de DIPEA dans le DMF anhydre. La suspension a été agitée sur une plaque rotatoire pendant 3h, puis a été lavée avec DMF (x3), MeOH (x3) puis DCM (x3).

Déprotection Fmoc :

Le groupement Fmoc a été retiré de la résine par traitement dans une solution à 20% pipéridine dans le DMF (2x 5min). La résine a été rincée au DCM (x1) entre les 2 traitements. La résine a ensuite été lavée avec DMF (x3), MeOH (x3) puis DCM (x3).

Couplage standard :

La résine a été placée dans un réacteur de plastique avec 3 eq. d'acide aminé, 3 eq. de PyBOP ou HATU, 3 eq. de 6 Cl-HOBt et 9 eq. de DIPEA dans le DMF anhydre. La suspension a été agitée sur une plaque rotatoire pendant 3 h, puis a été lavée avec DMF (x3), MeOH (x3) puis DCM (x3).

Test de Kaiser¹ :

Quelques grains de résine ont été placés dans une petite éprouvette de verre avec 1 goutte de solution phénol 80% dans l'éthanol, 1 goutte de KCN 0,001 M dans la pyridine et 1 goutte de ninhydrine 6% dans l'éthanol dans un incubateur à 95°C pendant 5 min. Le suivi de réaction a ensuite été effectué selon la couleur de la solution. Si les grains étaient bleus, le couplage était considéré comme non-complet et a été répété.

Acétylation N-terminale :

La résine a été placée dans un réacteur de plastique dans une solution fraîchement préparée de DCM/DIPEA/anhydride acétique (7:1,5:1,5 v/v/v). La suspension a été agitée sur une plaque rotatoire pendant 30 min, puis a été lavée avec DMF (x3), MeOH (x3) puis DCM (x3).

¹ Kaiser, E. et al. *Anal Biochem.* **1970**, 2, 595-598

Clivage HFIP (résine 2-CTC) :

La résine a été placée dans un flacon de verre dans une solution 20% HFIP dans le DCM, puis a été agitée à l'aide d'un barreau magnétique pendant 3 h. La solution a ensuite été filtrée puis séchée *in vacuo*. Le résidu obtenu a été précipité dans l'éther diéthylique froid. Le produit a été centrifugé puis l'éther décanté. Le culot a été resolubilisé dans le *tert*-butanol et l'eau (50:50 v/v) puis lyophilisé.

Clivage TFA/H₂O/TIPS (pour le clivage de peptides sans Amba en P1) :

La résine a été placée dans un flacon de verre dans un cocktail de clivage TFA/H₂O/TIPS (95:2,5:2,5 v/v/v), puis a été agitée à l'aide d'un barreau magnétique pendant 3 h. La solution a ensuite été filtrée puis séchée *in vacuo*. Le résidu obtenu a été précipité dans l'éther diéthylique froid. Le produit a été centrifugé puis l'éther décanté. Le culot a été resolubilisé dans le *tert*-butanol et l'eau (50:50 v/v) puis lyophilisé.

Couplage Amba :

Le peptide protégé au niveau de ses chaînes latérales, mais à la fonction carboxylate libre, a été placé dans un ballon de verre avec 2,5 eq. d'Amba, 2,7 eq. de PyBOP et 7,5 eq. de 6 Cl-HOBt dans le DMF anhydre. La solution a été agitée sur glace pendant 30 min, après quoi 7,5 eq. de DIPEA ont été ajoutés goutte à goutte sur une période de 15 min. La glace a par la suite été retirée et la solution a été laissée à agiter pendant 4h. Un mini-clivage au TFA a été effectué afin de déterminer si la réaction était complète. Le cas échéant, le parachèvement de la réaction a été effectué par l'acide acétique 50% puis le solvant a été séché *in vacuo* O/N.

Synthèse de Amba

1 eq. de 4-(aminométhyle)benzonitrile HCl a été dissous dans 45 mL de *tert*-butanol, 80 mL de solution NaOH 1,1 M et 20 mL de H₂O dans un ballon avec agitateur magnétique. Puis une solution de 1,1 eq. de dicarbonate de di-*tert*-butyle diluée dans 10 mL de *tert*-butanol a été ajoutée goutte à goutte pendant 1 h avant de laisser la réaction agir O/N dans le ballon laissé ouvert pour obtenir le produit I. Après séchage du produit *in vacuo*, le composé obtenu a été dissous dans le MeOH avec 2,5 eq de DIPEA, puis 1,5 eq. de chlorhydrate d'hydroxylamine a été ajouté. La réaction a été laissée O/N à reflux à 78°C.

Une fois la réaction terminée, le produit II a été obtenu par évaporation du MeOH *in vacuo*, ajout d'acétate d'éthyle puis extraction avec H₂O (x3), NaHCO₃ (x3) et saumure (x3) puis séchage *in vacuo*. Le produit II a été dissous dans l'acide acétique glacial auquel furent ajoutées 3 eq. d'anhydride acétique sous agitation. Après 1 h de réaction, du H₂O fut ajouté (concentration finale H₂O 10%) et du palladium sur charbon 10%. La réaction fut placée sous pression atmosphérique d'H₂ puis agitée pendant 72 h pour obtenir le produit III. Après filtration du produit sur Celite puis évaporation du solvant *in vacuo*, le composé a été lyophilisé. Après purification sur colonne en phase inverse, le produit fut solubilisé dans l'H₂O puis de l'acide chlorhydrique concentré fut ajouté jusqu'à une concentration finale de 20%. La réaction fut laissée O/N, puis la solution lyophilisée pour obtenir le produit IV (Amba) (Schéma 2).¹

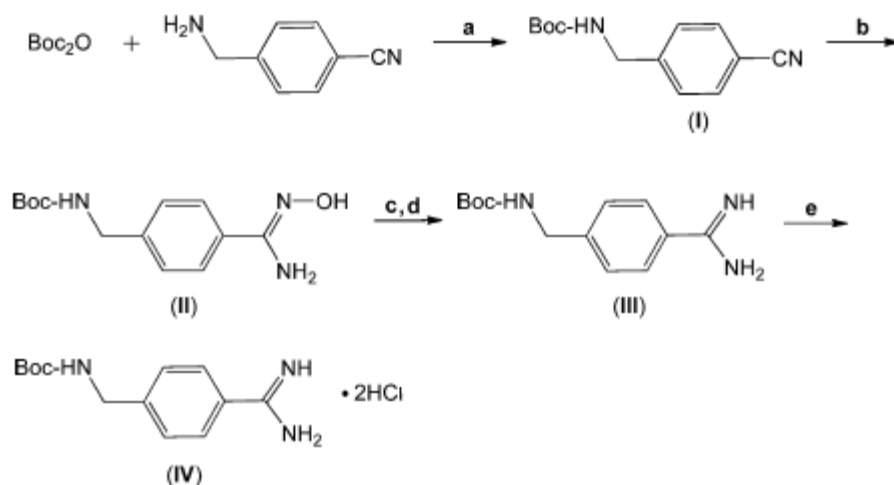


Schéma 2 : Conditions de réaction: (a) H₂O, 1,1 M NaOH, O/N; (b) NH₂-OH·HCl, DIPEA, MeOH, reflux 12h; (c) 3 eq. Ac₂O, AcOH; (d) 90% AcOH (aq), H₂, Pd/C (10%), 72h; (e) 25% HCl, H₂O, O/N.

Synthèse de C23

La résine 2-CTC a été couplée avec Fmoc-Lys(Boc)-OH selon le protocole de couplage à la résine 2-CTC, puis Fmoc a été retiré. Fmoc-Arg(Pbf)-OH a ensuite été couplé selon le protocole de couplage standard, puis Fmoc a été déprotégé. Chaque étape a été suivie par test Kaiser. Les cycles couplage-

¹ Synthèse basée sur Kwiatkowska, A. et al. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 98–109. L'étape « c » telle que décrite dans l'article a été modifiée selon le protocole décrit ci-haut.

déprotection ont été poursuivis jusqu'au dernier acide aminé, puis le peptide a été acétylé. Le peptide a été clivé de la résine par solution HFIP, puis lyophilisé pour obtenir une poudre blanche. L'Amba a été couplé au produit, puis ce dernier a été clivé au TFA/H₂O/TIPS et lyophilisé avant d'être purifié.

Synthèse des analogues MLAGm et DML-Agm

La résine 2-CTC a été couplée avec 4 eq. de 1,4-diaminobutane pendant 2,5 h . Les cycles couplage-déprotection ont été poursuivis jusqu'au dernier acide aminé, puis le peptide a été acétylé. Le peptide a été clivé de la résine par solution HFIP, puis lyophilisé pour obtenir une poudre blanche. L'amine secondaire en C-terminal a été traitée O/N avec 6 eq. de 1H-pyrazole-1-carboxamide HCl et 12 eq. de DIPEA dans le DMF anhydre pour obtenir la guanidine correspondante. Le produit a ensuite été clivé au TFA/H₂O/TIPS et lyophilisé avant d'être purifié.

Synthèse des analogues OrnAmba ML et DOrnAmba ML

Le protocole de synthèse utilisé fut le même que C23, à la différence que le couplage de l'acide aminé en P2 a été permuté par un couplage avec la Fmoc-Ornithine dans des conditions de couplage standard. Une L-leucine ou une D-leucine a été couplée en P8, selon l'analogue.

Synthèse des analogues Tle ML, DTle ML, CycloLeu ML et HomoCyclo ML

Le protocole de synthèse utilisé fut le même que C23, à la différence que le couplage de l'acide aminé en P3 a été permuté par un couplage avec la Fmoc-*tert*-leucine, le Fmoc-acide 1-aminocyclopentanoïque ou le Fmoc-acide 1-aminocyclohexanoïque, selon l'analogue, dans des conditions de couplage standard. Une L-leucine ou une D-leucine a été couplée en P8, selon l'analogue.

Synthèse des analogues NMeVal ML et DNMeVal ML

Le protocole de synthèse utilisé fut le même que C23, à la différence que le couplage de l'acide aminé en P3 a été permuté par un couplage avec la Fmoc-N-méthyl-valine dans des conditions de couplage standard. Le couplage de l'acide aminé en P4 a été effectué avec 4 eq. de Fmoc-arginine-OH, 3 eq. de

DMTMM et 6 eq. de DIPEA dans le NMP. Une L-leucine ou une D-leucine a été couplée en P8, selon l'analogue.

Synthèse des analogues CapAc ML, Isocap ML, ValAc ML, Isoval ML, 2-Me-ValAc ML, 3-Me-ValAc ML

Le protocole de synthèse utilisé fut le même que C23, à la différence que le couplage de l'acide aminé en P8 a été permuté par un couplage avec l'acide correspondant dans les conditions de couplage suivantes : 3 eq. d'acide, 3 eq. de PyBOP et 9 eq. de DIPEA dans le DMF anhydre.

Synthèse des analogues 4-AMePhac 3ML, 4-AMePhac MLL, 4-AMePhac dML, 3-Apaa 3ML, 3-Apaa ML et 3-Apaa dML

Le protocole de synthèse utilisé fut le même que C23, à la différence que le couplage en P8 ou P9 (selon l'analogue) fut permuté par une étape de couplage avec l'acide 4-Boc-aminométhylphényllactétique (analogues 4-AMePhac ML) ou l'acide 4-Boc-aminophényllactétique (analogues 3-Apaa ML) dans des conditions de couplage standard. Chez les analogues 4-AMePhac ML et 3-Apaa ML, une L-leucine a été couplée en P8.

Synthèse des analogues 3HH, 3HN, 3NH, 3NN, AHH, AHN, ANH et ANN

Le protocole de synthèse utilisé fut le même que C23, à la différence du couplage de la *tert*-leucine en P3, de l'homoleucine ou norleucine en P5 et P7 (selon l'analogue) et de l'acide 4-Boc-aminométhylphényllactétique ou l'acide 4-Boc-aminophényllactétique en P9 (selon l'analogue) dans des conditions de couplage standard.

Synthèse des analogues marqués FITC

Les premières étapes du protocole utilisé pour la synthèse de l'analogue FITC-4L sont les mêmes que celles de C23 jusqu'à la quatrième leucine. L'étape d'acétylation a été remplacée par le couplage de la bêta-alanine (acide 3-aminopropanoïque) dans des conditions de couplage standard. 1,5 eq. FITC a

ensuite été couplé dans une solution 20% pyridine dans le DCM O/N dans des ballons emballés dans du papier d'aluminium pour protéger le composé de la lumière. Le peptide a été clivé de la résine par HFIP, puis lyophilisé, le tout dans des contenants entourés de papier d'aluminium. L'Amba a été couplé au produit, puis ce dernier a été clivé au TFA/H₂O/TIPS et lyophilisé, toujours sous protection de la lumière par papier d'aluminium. La purification a été effectuée sans protection additionnelle, mais la lyophilisation et le stockage subséquent ont été effectués à l'abri de la lumière.

Essais enzymatiques

Les PCs humaines recombinantes ont été produites à partir de cellules S2 d'insectes et purifiées comme décrites antérieurement (Fugère *et al.*, 2002). Les essais enzymatiques d'inhibition de la furine ont été effectués dans le tampon Hepes 100 mM pH 7,5, CaCl₂ 1mM, β- mercaptoethanol 1mM et BSA 1,8 mg/mL. Les essais enzymatiques de PACE4 ont été effectués dans le tampon Bis-Tris 20 mM pH 6,5, CaCl₂ et BSA 1,8 mg/mL. Le substrat utilisé dans les essais est le pyroGlu-Arg-Val-Lys-Arg-methyl-coumaryl-7-amide (Bachem, CA) à 100 μM. Les essais ont été effectués à 37°C pendant 60 min durant laquelle la fluorescence a été dosée en temps réel avec un spectrofluorimètre Gemini EM 96 puits (Molecular Devices, CA) (λEM, 370 nm; λEX., 460 nm; CutOff, 435 nm). L'inhibition compétitive a été évaluée par ajout de concentration décroissante de peptide (Levesque *et al.*, 2012). Les données brutes furent prélevées, puis les valeurs d'IC₅₀ calculées, à partir du logiciel SoftMax Pro 5. Les valeurs de Ki ont été calculées sur GraphPad Prism 7 à partir des valeurs d'IC₅₀ selon l'équation de Morrison pour inhibiteurs «tight binding».

Culture cellulaire et tests MTT

Les lignées de cellules DU145 ont étéensemencées à une densité de 1 500 cellules par puits dans des plaques à 96 puits. Les cellules LNCaP ont étéensemencées à une densité de 2500 cellules par puits dans une plaque à 96 puits recouverte de poly-lysine. Après 24 heures, le milieu a été changé et les analogues peptidiques ont été ajoutés aux cellules. Les peptides ont été incubés avec les cellules pendant 72 heures, puis le réactif MTT a été ajouté à une concentration finale de 1 mg/ml. Le réactif MTT a été laissé à incuber pendant 4 heures, puis le milieu a été retiré et le formazan a été solubilisé avec 100 μL d'isopropanol:HCl (24:1 N). L'activité métabolique totale a été normalisée par rapport aux cellules traitées. Chaque étape de MTT, ainsi que la maintenance des cellules DU145 et LNCaP, ont été

réalisées dans du RPMI 1640 5% FBS (pour DU145) ou 10% FBS (LNCaP). Les IC50 ont été déterminés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7.2.

Protocole d'essai de stabilité plasmatique

Les solutions de peptides (dilués dans H₂O) ont été incubées dans le plasma à 37°C à une concentration finale d'inhibiteur de 50 µM. À chaque point de contrôle, 25 µL de plasma a été précipité dans 150 µL de MeOH contenant 20 µM de Fmoc-Leucine-OH (standard interne). Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 12000 g pendant 10 min. Le surnageant a ensuite été filtré, puis le filtrat a été dosé par UPLC-MS en Single Ion Mode.

Essais d'absorption cellulaire par cytométrie de flux (FACS)

L'absorption des peptides FITC a été testée sur des cellules DU145 et analysée avec un cytomètre FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA). 4x10⁵ cellules ont été incubées pendant 1 h dans un milieu RPMI sans sérum avec 10 µM de l'analogue analysé, recueillies par centrifugation. Les culots cellulaires ont été lavés deux fois avec de la trypsine (0,05% v/v) pendant 5 minutes à 37°C afin d'éliminer les interactions non-spécifiques avec la membrane. Les cellules ont été incubées pendant 2 minutes avec de l'iodure de propidium (10 µg/mL) afin de permettre d'exclure les cellules avec une membrane altérée. Un minimum de 10 000 événements par échantillon ont été acquis, excluant les amas de cellules et les débris. Les GeoMeans ont été déterminés à l'aide du logiciel CellQuest (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

Protocole PAMPA

Une solution de 1% (p/v) de lécithine dans le dodécane a été placée au bain sonique pour une durée de 5 minutes. 5 µL de cette solution a été déposé délicatement dans chaque puits utilisé d'une plaque 96 puits spéciale avec filtre pour essai de perméabilité (Millipore Corporation), puis a été laissé à sécher pour une durée de 5 minutes. 150 µL de la solution de peptide (concentration de peptide et nature du tampon variables selon l'essai) a été versé sur la membrane de dodécane. 300 µL du tampon utilisé dans le puits donneur a été versé dans le puits accepteur correspondant. Les plaques donneuse et accepteuse ont ensuite été superposées. Les plaques superposées ont été placées dans un agitateur mécanique

(température, rpm et durée variables). Une fois le temps imparti échu, 50 μ L de solution ont été prélevés dans les puits accepteurs et dosés immédiatement par UPLC-MS en Single Ion Mode. 50 μ L d'une concentration connue de Fmoc-Leu-OH a été utilisé comme standard interne dans certains essais. Tous les essais ont été menés en triplicata.

ANNEXE 2 : TABLEAU DE CARACTÉRISATION DES COMPOSÉS PEPTIDIQUES

Séquence	t _R [min]	Masse exacte calculée (M+)	(M+2H) ²⁺ observé	Erreur ppm	(M+3H) ³⁺ observé	Erreur ppm
Analogues tronqués :						
Ac-RVK-Amba	19.92 ^A	574.3704	288.1934	3.30	(M+H) ⁺ 575.381	5.90
Ac-LRVK-Amba	20.99 ^B	687.4544	344.7351	1.80	230.1593	2.40
Ac-LLRVK-Amba	15.41 ^C	800.5385	401.2735	-7.50	267.8542	2.90
Ac-LLLRVK-Amba	19.39 ^C	913.6225	457.8153	-7.10	305.5471	-3.40
Ac-RVKR-NH ₂	8.93 ^D	598.4027	300.208	-2.10	(M+H) ⁺ 599.4126	4.40
Ac-LRVK-NH ₂	7.80 ^E	711.4868	356.7497	-2.70	238.1683	-5.20
Ac-LLRVK-NH ₂	5.86 ^F	824.5708	413.2933	1.50	275.8643	0.30
Ac-LLLRVK-NH ₂	7.14 ^F	937.6549	313.5584	-1.60	469.8357	2.10
Analogues modifiés P1 :						
Ac-LLLLRVK-Agm	15.89 ^G	1007.7332	504.8739	0.10	336.9188	1.40
Ac-[DLeu]LLLLRVK-Agm	25.25 ^C	1007.7332	504.8771	6.40	336.9208	7.30
Analogues modifiés P2 :						
Ac-LLLLRV[Orn]-Amba	31.04 ^C	1012.6910	507.3559	6.20	338.5730	6.10
Ac-[DLeu]LLLLRV[Orn]-Amba	31.71 ^C	1012.6910	507.3567	7.80	338.5735	7.60
Analogues modifiés P3 :						
Ac-LLLLR[Tle ML]K-Amba	9.34 ^F	1040.7273	521.3709	4.80	347.9165	5.20
Ac-[DLeu]LLLLR[Tle ML]K-Amba	16.80 ^G	1040.7273	521.3713	5.60	347.9164	4.90
Ac-[DLeu]LLLLR[CycloLeu]K-Amba	16.41 ^G	1038.7066	520.3625	3.7	347.2439	3.1
Ac-[DLeu]LLLLR[HomoCycloLeu]K-Amba	16.83 ^G	1052.7223	527.3714	4.8	351.9169	6.5
Ac-LLLLR[N-MeVal]K-Amba	16.57 ^G	1040.7223	521.3719	6.70	347.9157	2.90
Ac-[DLeu]LLLLR[N-MeVal]K-Amba	16.89 ^G	1040.7223	521.3704	3.80	347.9161	4.00
Analogues modifiés N-terminal (P8) :						
CapAc ML-LLLLRVK-Amba	9.50 ^F	969.6851	485.8526	5.70	324.2374	5.40
IsoCap-LLLLRVK-Amba	27.31 ^C	969.6851	485.8530	6.50	324.2371	4.40
ValAc ML-LLLLRVK-Amba	25.33 ^C	955.6695	478.8447	5.60	319.5652	4.50
IsoVal-LLLLRVK-Amba	8.84 ^F	955.6695	478.8396	-5.10	319.5614	-7.40
2MeValAc ML-LLLLRVK-Amba	9.33 ^F	969.6851	485.8481	-3.60	324.2327	-9.10
3MeValAc ML-LLLLRVK-Amba	9.38 ^F	969.6851	485.8487	-2.40	324.2339	-5.40
4-AMePhac ML-LLLLRVK-Amba	17.63 ^C	1018.6804	510.3477	0.40	340.5677	0.90
Analogues modifiés N-terminal (P9) :						
Phac-LLLLRVK-Amba	10.47 ^F	1102.7379	552.3775	2.30	368.5870	1.10
Phac-[DLeu]LLLLRVK-Amba	10.55 ^F	1102.7379	552.3766	0.70	368.5869	0.90

DiPhac-LLLLRVK-Amba	11.77 ^F	1178.7692	590.3960	7.00	393.9322	4.70
DiPhac-[DLeu]LLLLRVK-Amba	11.73 ^F	1178.7692	590.3952	5.60	393.9323	5.00
3-Apaa ML-LLLLRVK-Amba	20.95 ^C	1117.7488	559.8820	0.90	373.5911	2.40
3-Apaa ML-[DLeu]LLLLRVK-Amba	21.83 ^C	1117.7488	559.8826	1.60	373.5911	2.40
4-AMePhac ML-LLLLRVK-Amba	20.65 ^C	1131.7645	566.8871	-4.20	378.2608	-3.40
4-AMePhac ML-[DLeu]LLLLRVK-Amba	21.68 ^C	1131.7645	566.8871	-3.20	378.2607	-3.70
Analogues combinés :						
3-Apaa ML-[DLeu][HoLeu]LL[HoLeu]R[Tle ML]K-Amba	16.57 ^G	1159.7958	580.9079	4.7	387.6092	8.6
3-Apaa ML-[DLeu][HoLeu]LL[Nie]R[Tle ML]K-Amba	16.07 ^G	1145.7801	573.8996,	4.0	382.9358	4.8
3-Apaa ML-[DLeu][Nie]LL[HoLeu]R[Tle ML]K-Amba	15.86 ^G	1145.7801	573.8979	1.0	382.9350	2.7
3-Apaa ML-[DLeu][Nie]LL[Nie]R[Tle ML]K-Amba	15.27 ^G	1131.7645	566.8906	1.9	378,2631	2.7
4-AMePhac ML-[DLeu][HoLeu]LL[HoLeu]R[Tle ML]K-Amba	16.39 ^G	1173.8114	587.9125	-0.8	392.2778	0.9
4-AMePhac ML-[DLeu][HoLeu]LL[Nie]R[Tle ML]K-Amba	15.88 ^G	1159.7958	580.9060	1.5	387.6069	2.7
4-AMePhac ML-[DLeu][Nie]LL[HoLeu]R[Tle ML]K-Amba	15.67 ^G	1159.7958	580.9051	-0.1	387.6066	1.9
4-AMePhac ML-[DLeu][Nie]LL[Nie]R[Tle ML]K-Amba	15.19 ^G	1145.7801	573.8969	-0.7	382.9335	-1.2
Analogues fluorescents :						
FITC-βAla-RVK-Amba	12.01 ^G	992.4327	497.2229	-1.5	331.8173	-2.6
FITC-βAla-LRVK-Amba	13.98 ^G	1105.5168	553.7678	3.9	369.5147	5.0
FITC-βAla-LLRVK-Amba	15.75 ^G	1218.6008	610.3069	-1.8	407.2073	-0.6
FITC-βAla-LLLLRVK-Amba	16.85 ^G	1331.6849	666.8528	4.6	444.9057	7.8

Annotations:

^A Gradient linéaire de 2 à 20% de B (ACN + 0,1% TFA) dans A (H₂O + 0,1% TFA) pendant 50 min, débit de 1,0 mL/min (Colonne C18 Phenomenex Jupiter 5u 300Å, 250 x 4,6 mm) sur HPLC phase inverse Agilent

^B Gradient linéaire de 2 à 45% de B dans A pendant 50 min, débit de 1,0 mL/min (Colonne C18 Phenomenex Jupiter 5u 300Å, 250 x 4,6 mm) sur HPLC phase inverse Agilent

^C Gradient linéaire de 10 à 70% de B dans A pendant 50 min, débit de 1,0 mL/min (Colonne C18 Phenomenex Jupiter 5u 300Å, 250 x 4,6 mm) sur HPLC phase inverse Agilent

^D Gradient linéaire de 2 à 15% de B dans A pendant 16 min, débit de 1,0 mL/min (Colonne C18 ZORBAX Eclipse Plus, 100 x 4.6 mm, 3,5 µm) sur HPLC phase inverse Agilent

^E Gradient linéaire de 2 à 40% de B dans A pendant 16 min, débit de 1,0 mL/min (Colonne C18 ZORBAX Eclipse Plus, 100 x 4.6 mm, 3,5 µm) sur HPLC phase inverse Agilent

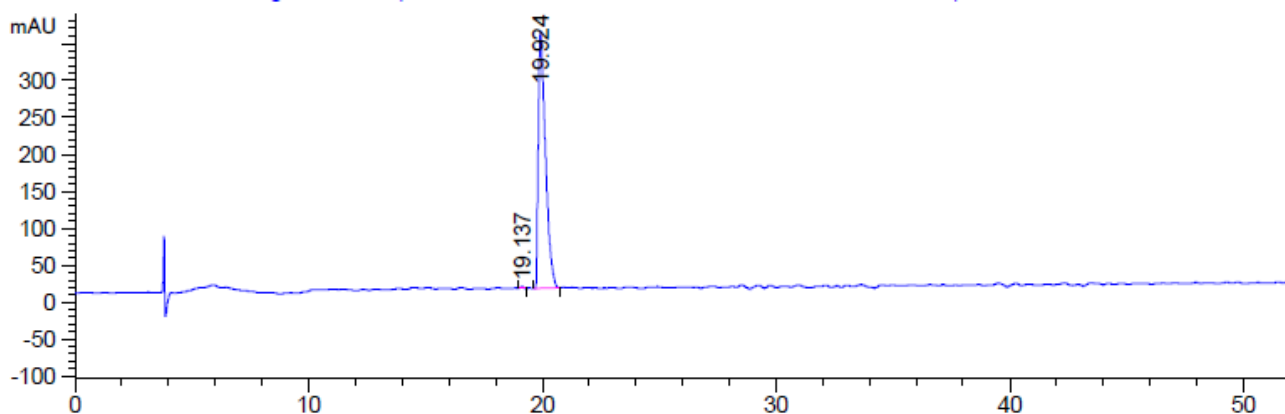
^F Gradient linéaire de 10 à 70% de B dans A pendant 16 min, débit de 1,0 mL/min (Colonne C18 ZORBAX Eclipse Plus, 100 x 4.6 mm, 3,5 µm) sur HPLC phase inverse Agilent

^G Gradient linéaire de 20 à 80% de B dans A pendant 25 min, débit de 0,5 mL/min (Colonne C18 Agilent AdvanceBio Peptide Mapping 120Å, 3.0 x 5 mm, 2.7 µm) sur HPLC phase inverse Agilent

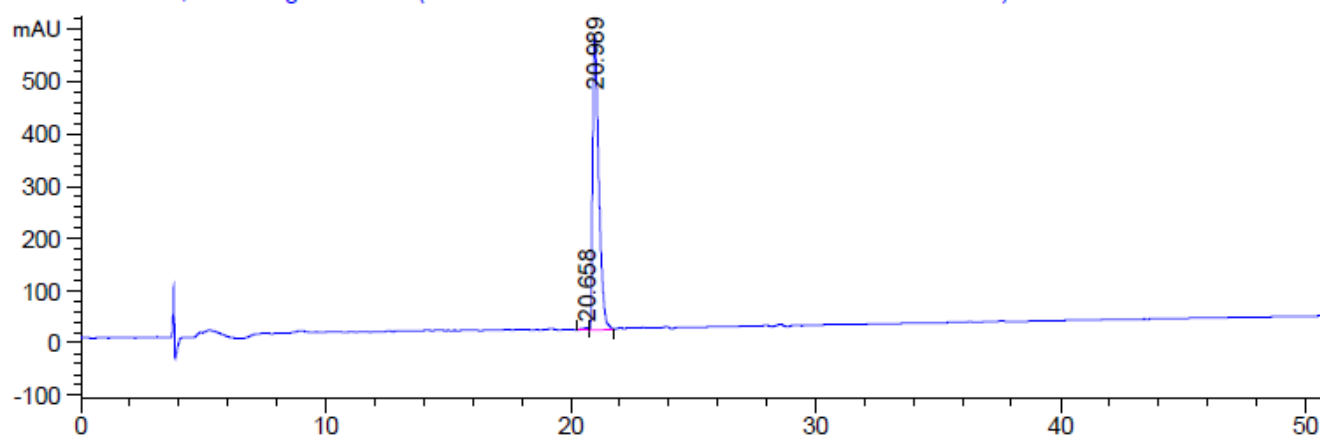
ANNEXE 3 : SPECTRES DE CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE HAUTE
PERFORMANCE

Note : Tous les spectres illustrés dans la section sous-jacente ont été obtenus sous $\lambda = 214$ nm. Sauf mention contraire, les produits présentés ci-contre ont une pureté de >95% selon HPLC quantitative.

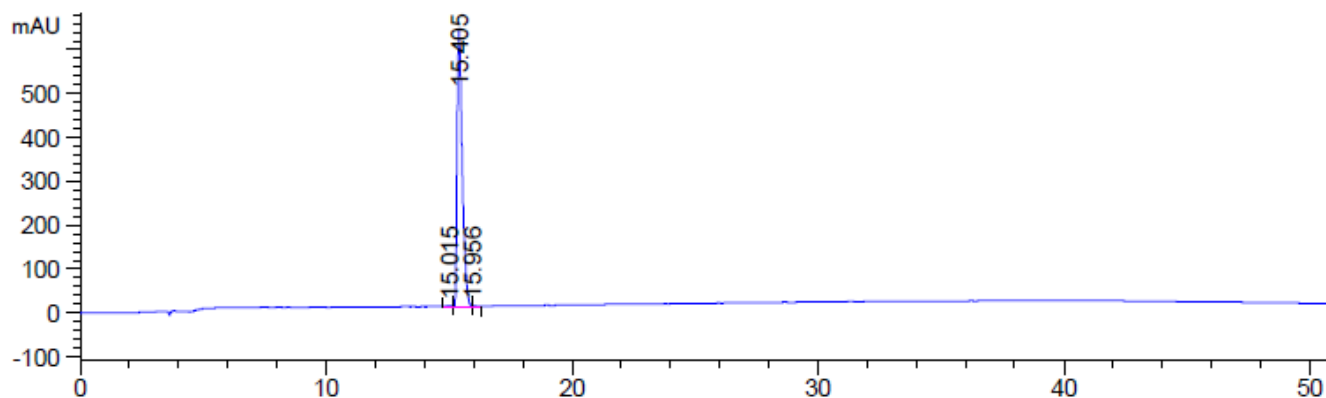
Ac-RVK-Amba



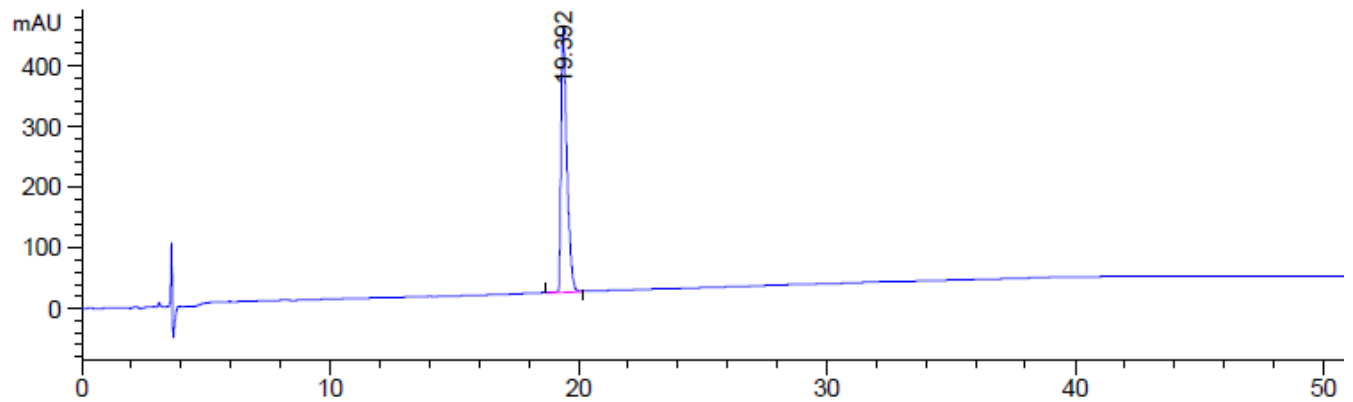
Ac-LRVK-Amba



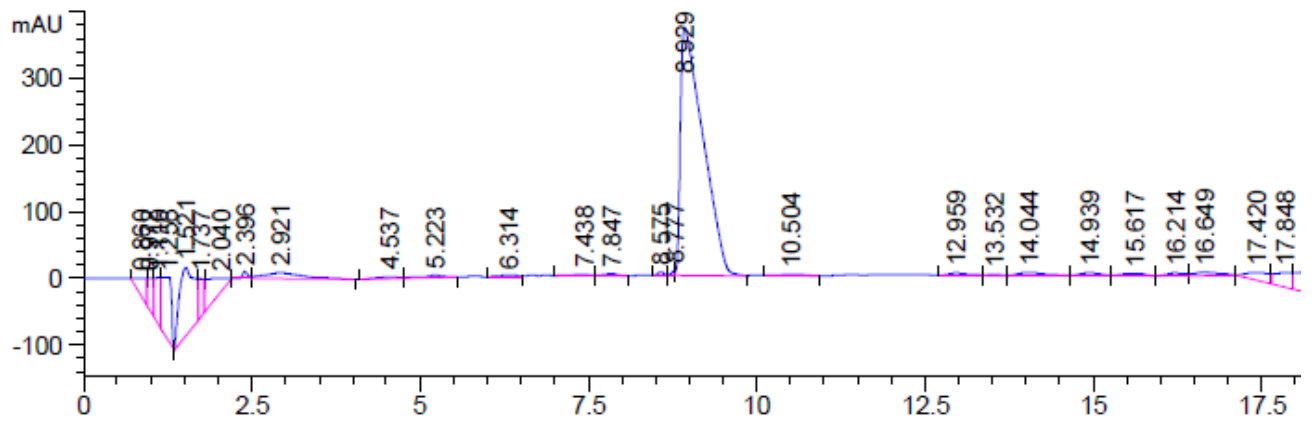
Ac-LLRVK-Amba



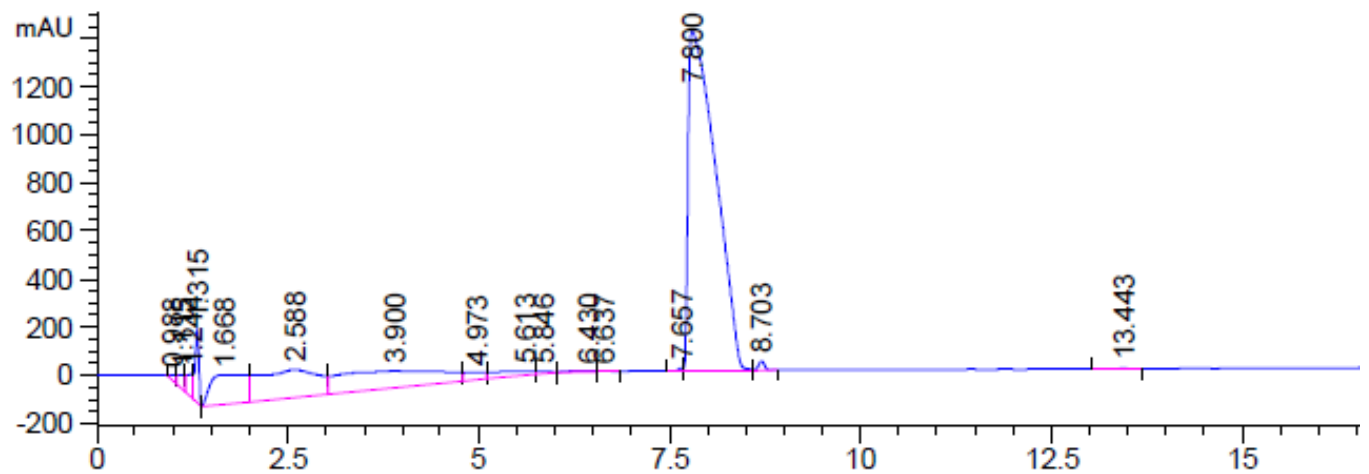
Ac-LLLRVK-Amba



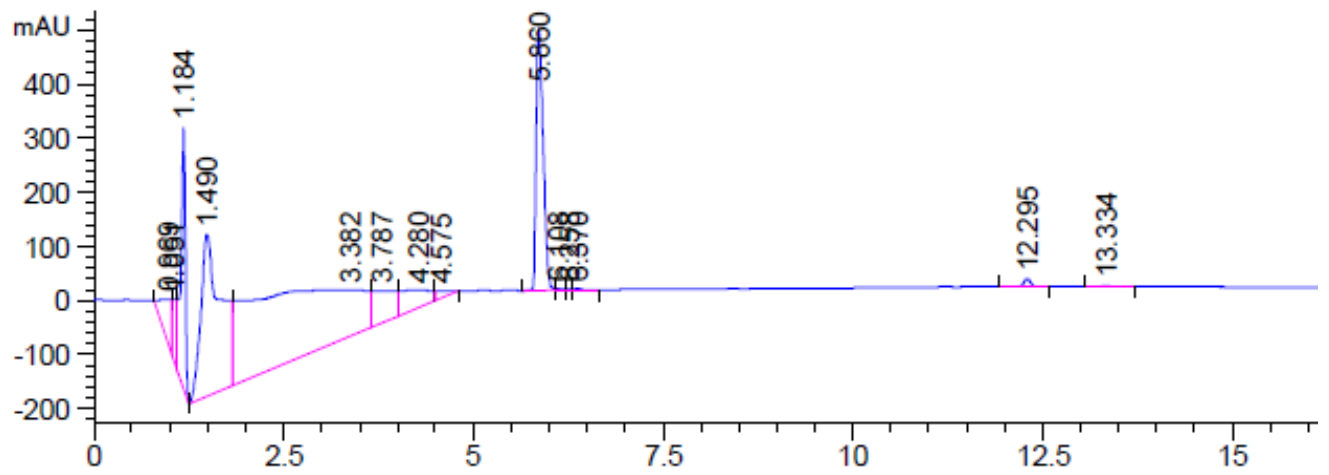
Ac-RVKR-NH2



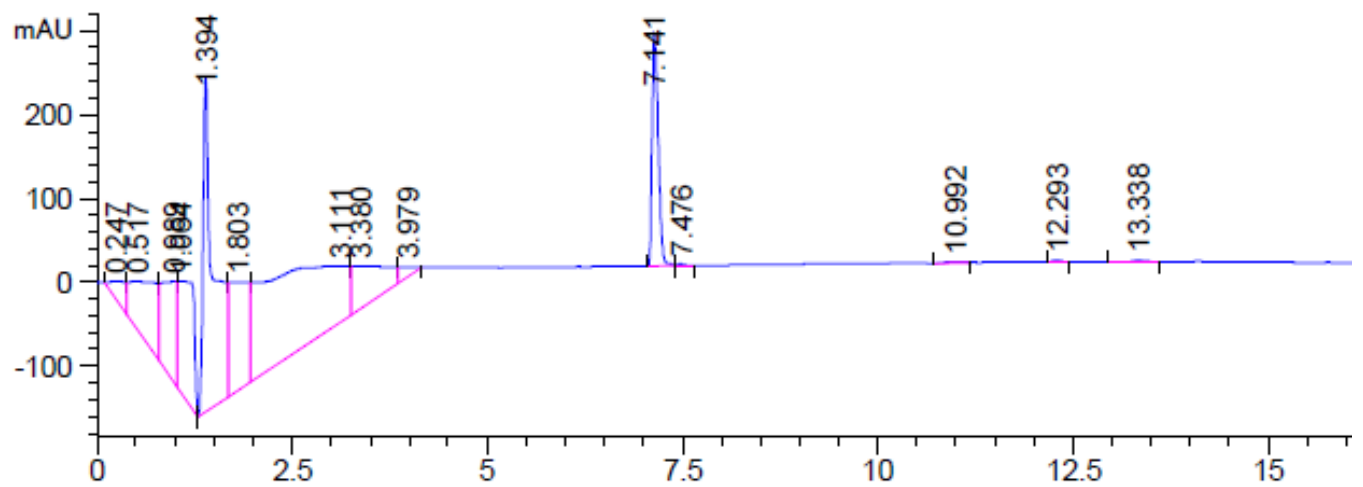
Ac-LRVK-NH2



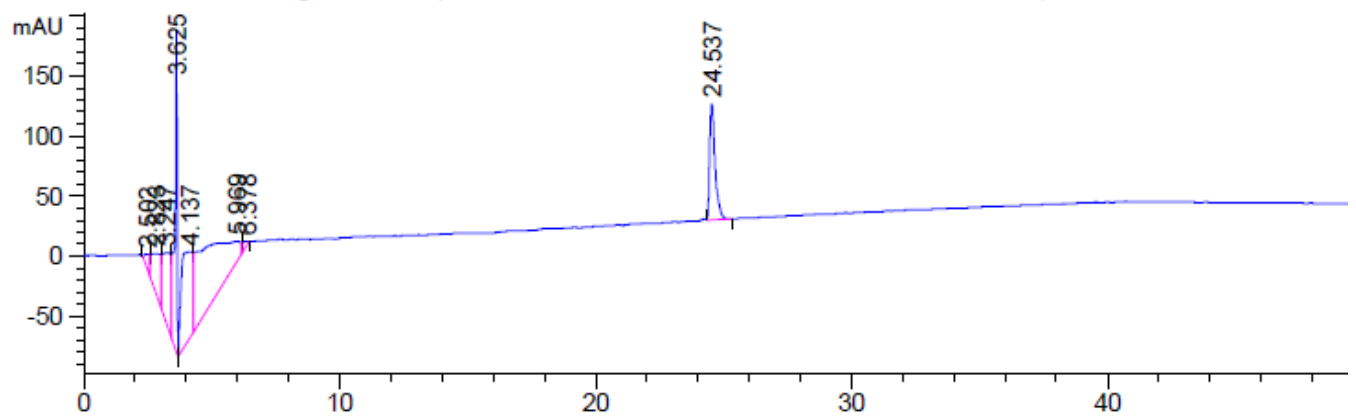
Ac-LLRVK-NH2



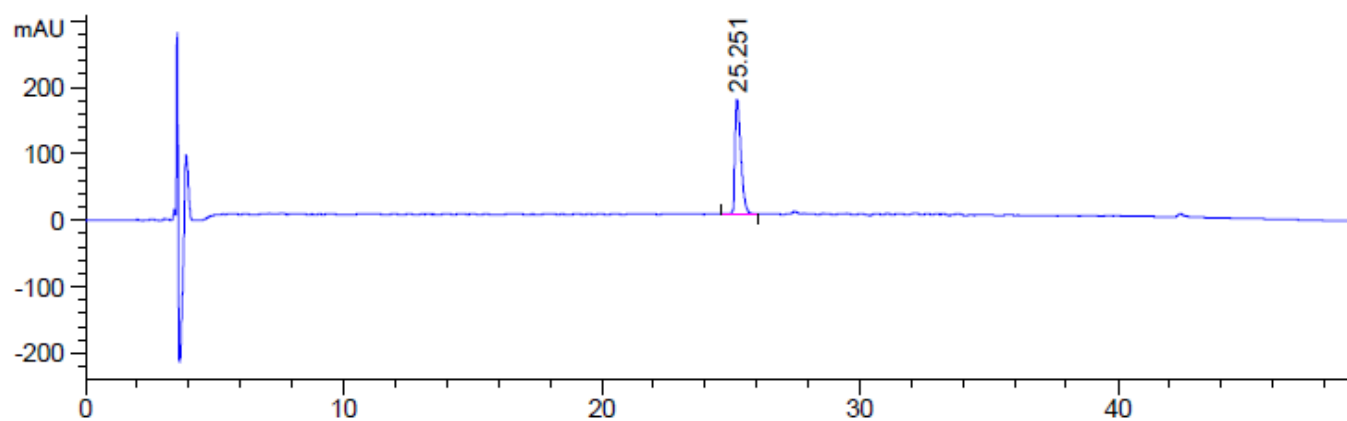
Ac-LLLRVK-NH2



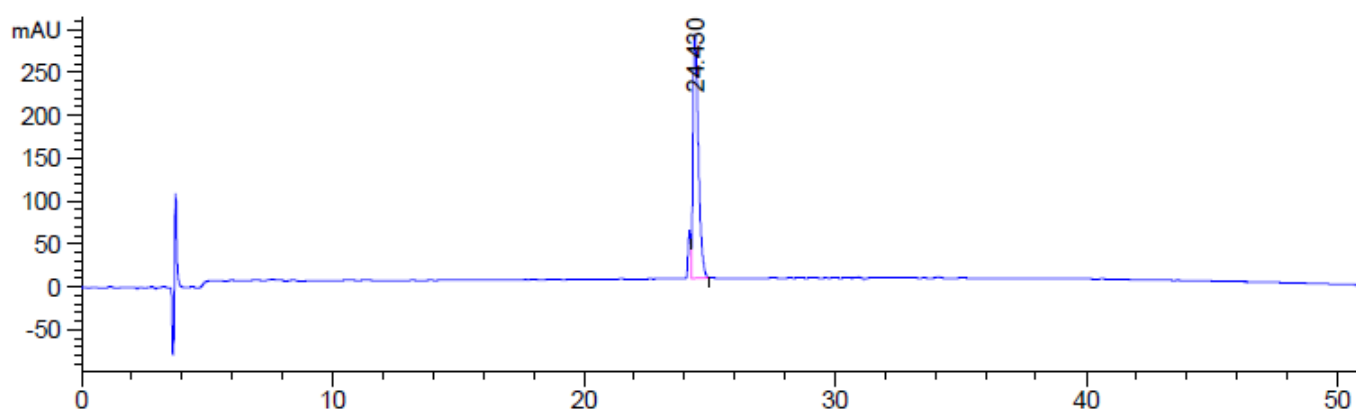
Ac-LLLLRVK-Agm



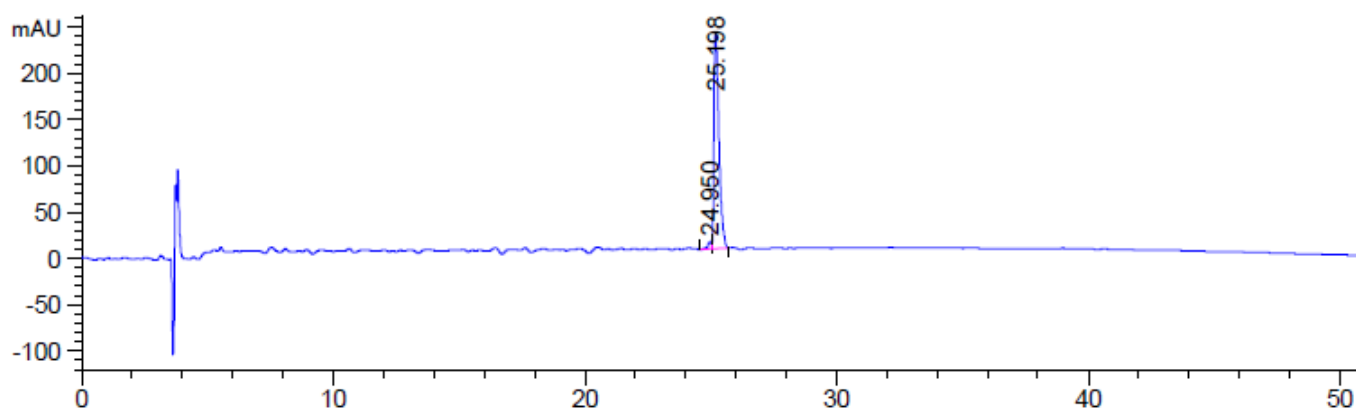
Ac-[DLeu]LLLRVK-Agm



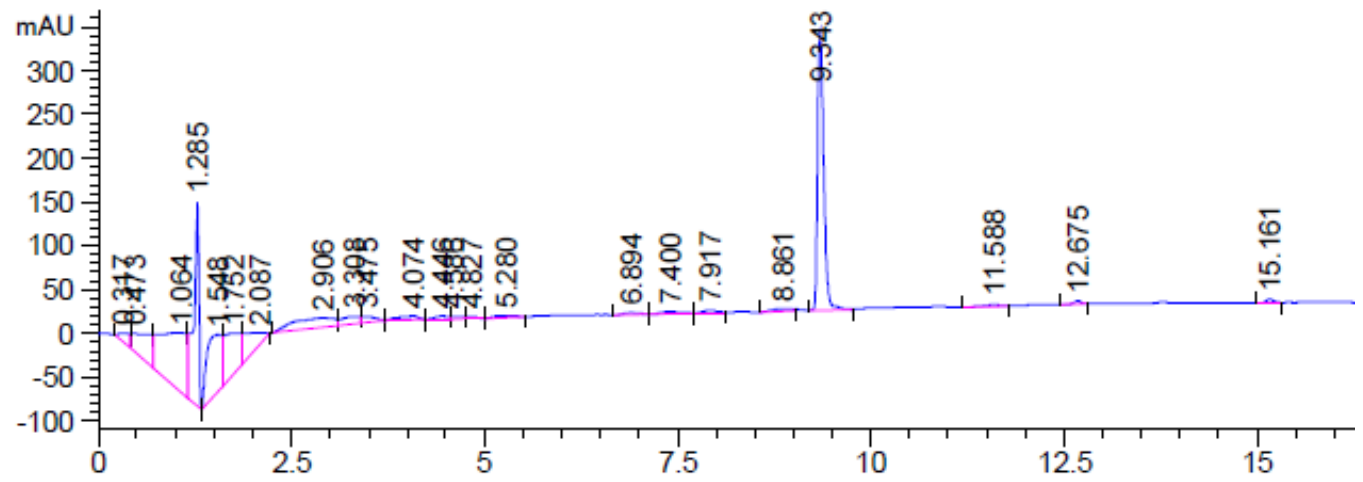
Ac-LLLLRV[Orn]-Amba



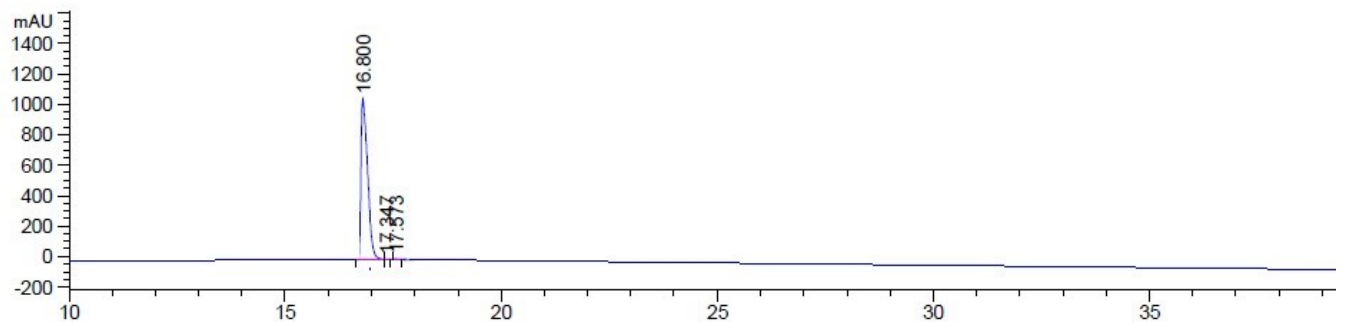
Ac-[DLeu]LLLRV[Orn]-Amba



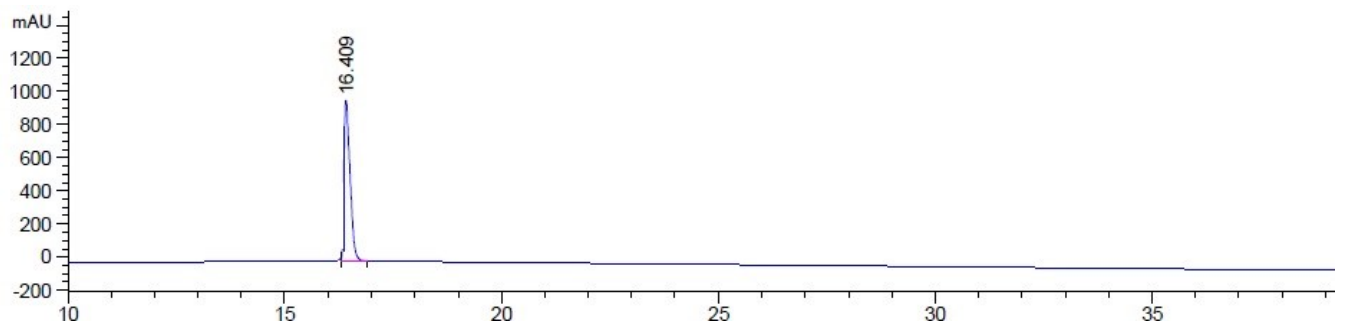
Ac-LLLLR[Tle]K-Amba



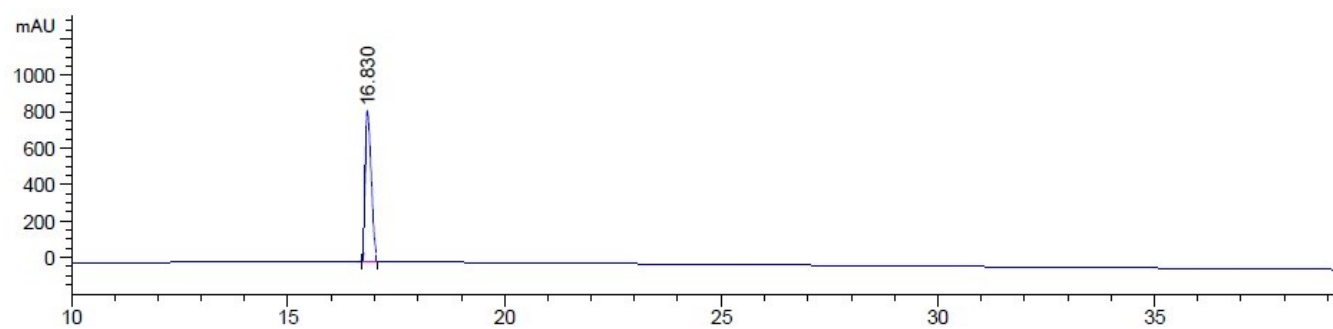
Ac-[DLeu]LLLLR[Tle]K-Amba



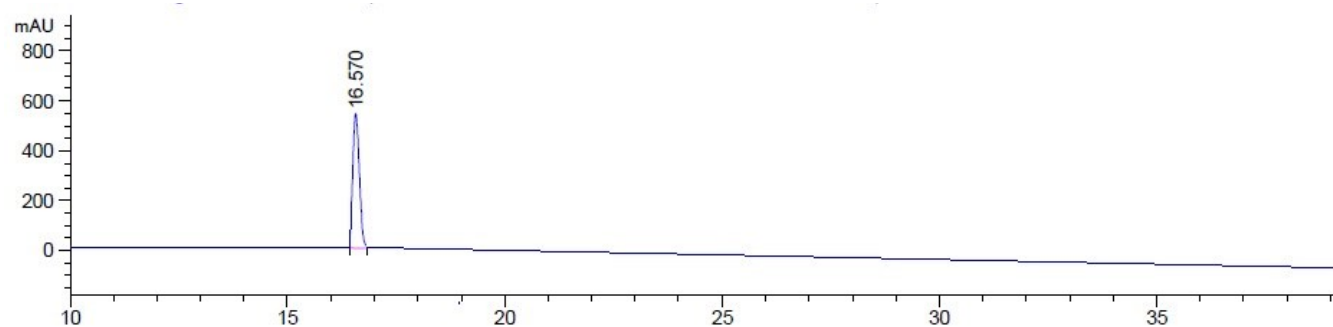
Ac-[DLeu]LLLLR[CycloLeu]K-Amba



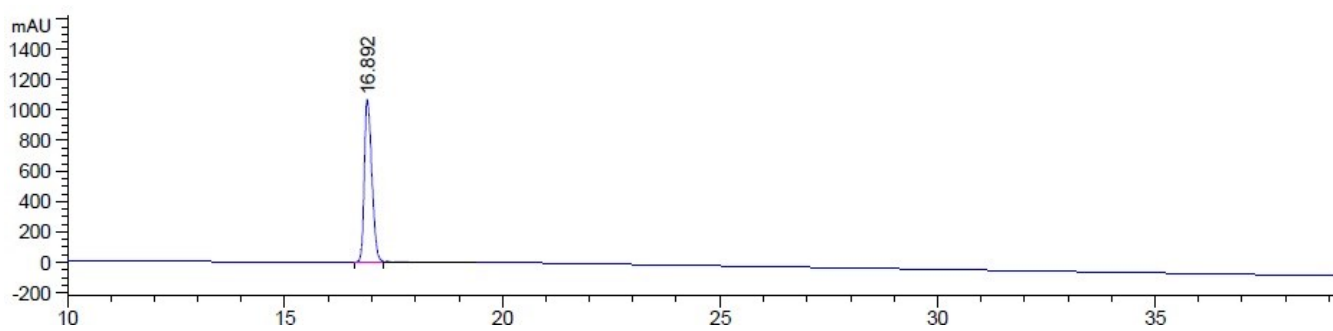
Ac-[DLeu]LLLR[HomoCycloLeu]K-Amba



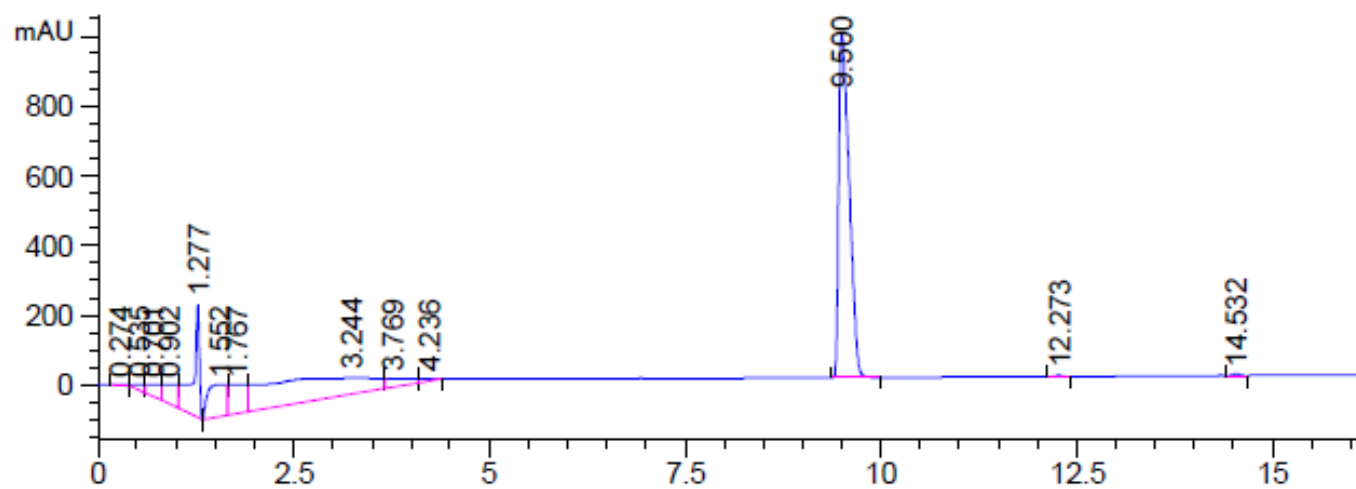
Ac-LLLLR[N-MeVal]K-Amba



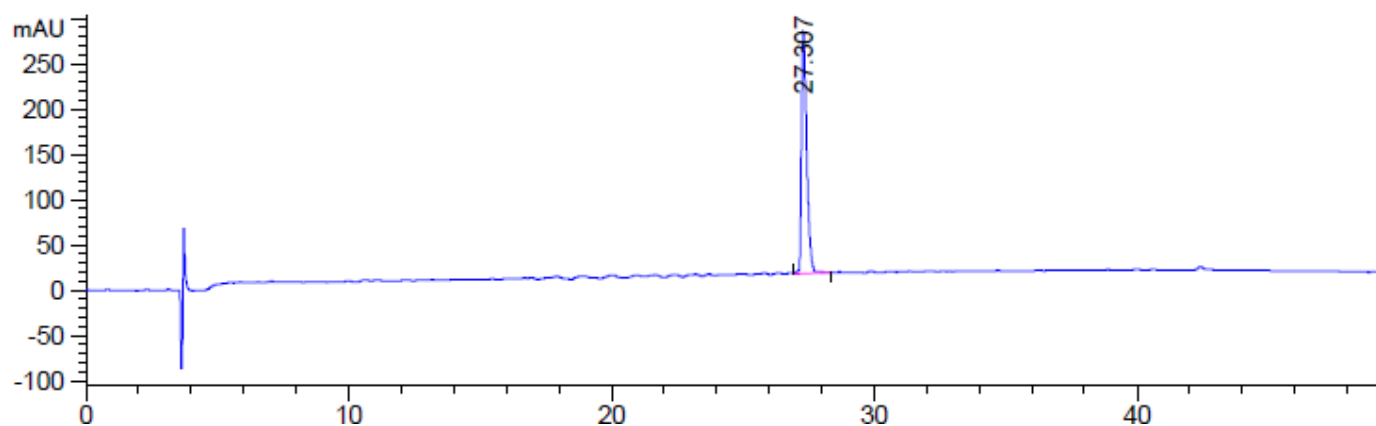
Ac-[DLeu]LLLR[N-MeVal]K-Amba



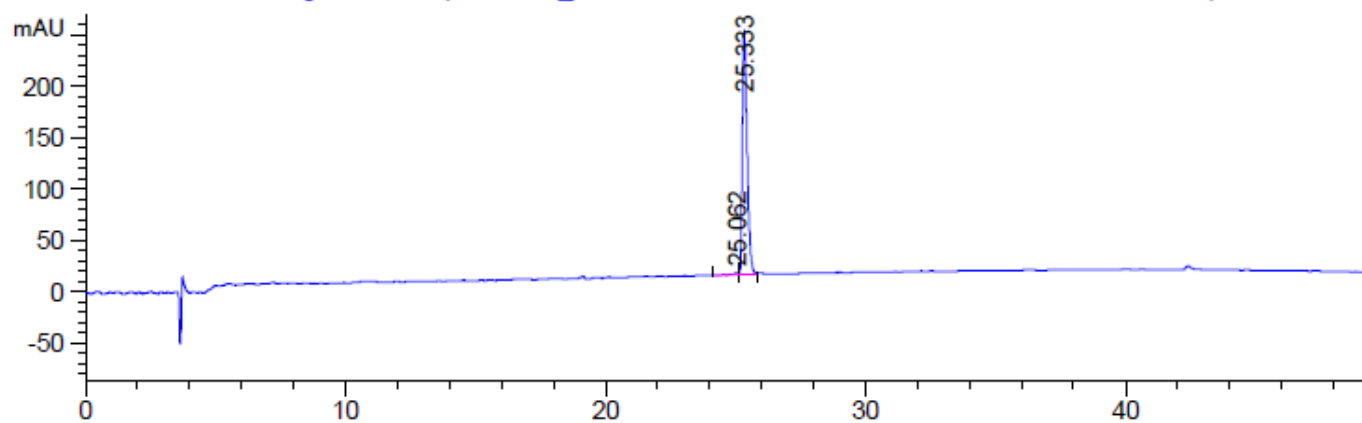
CapAc-LLLRVK-Amba



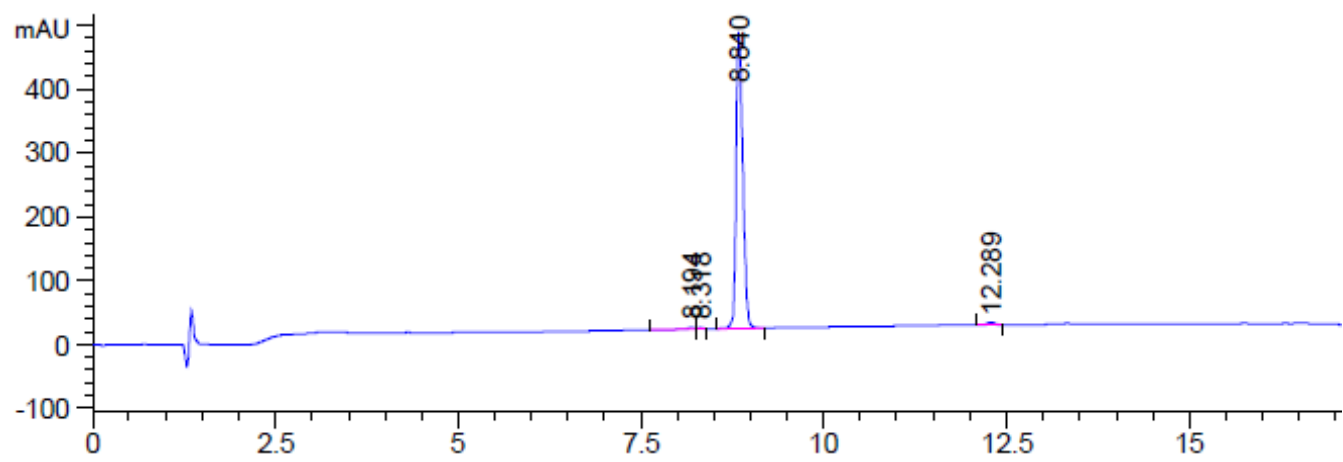
IsoCap-LLLRVK-Amba



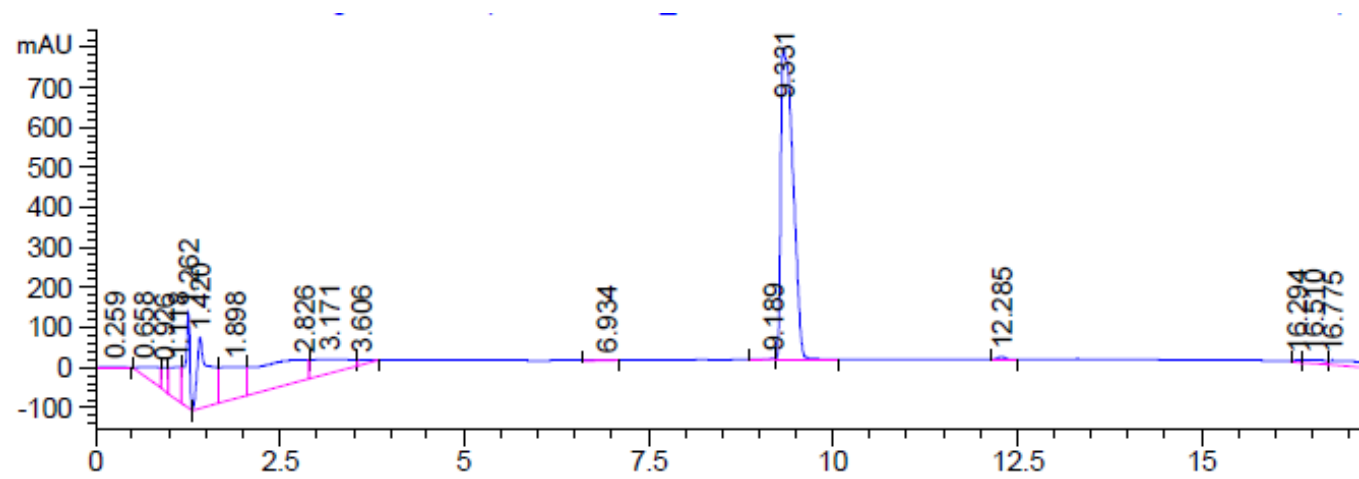
ValAc-LLLRVK-Amba



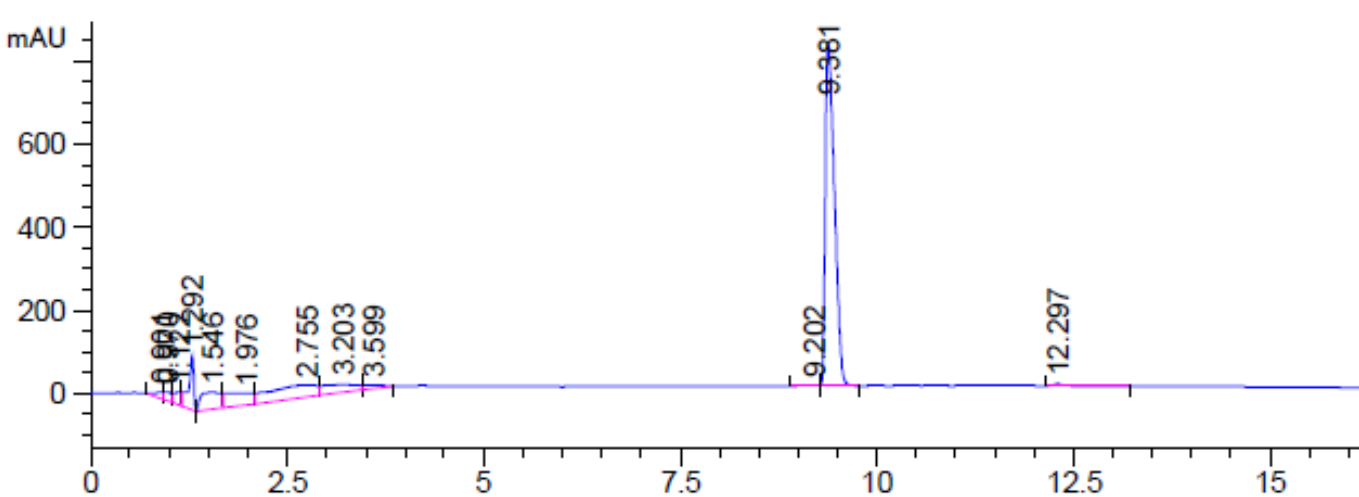
IsoVal-LLLRVK-Amba



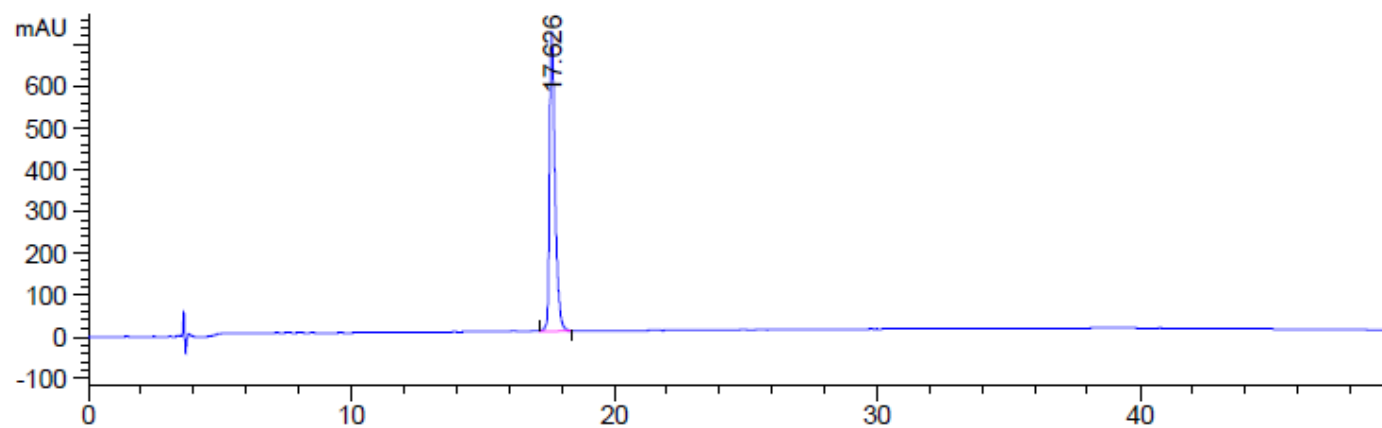
2MeValAc-LLLRVK-Amba



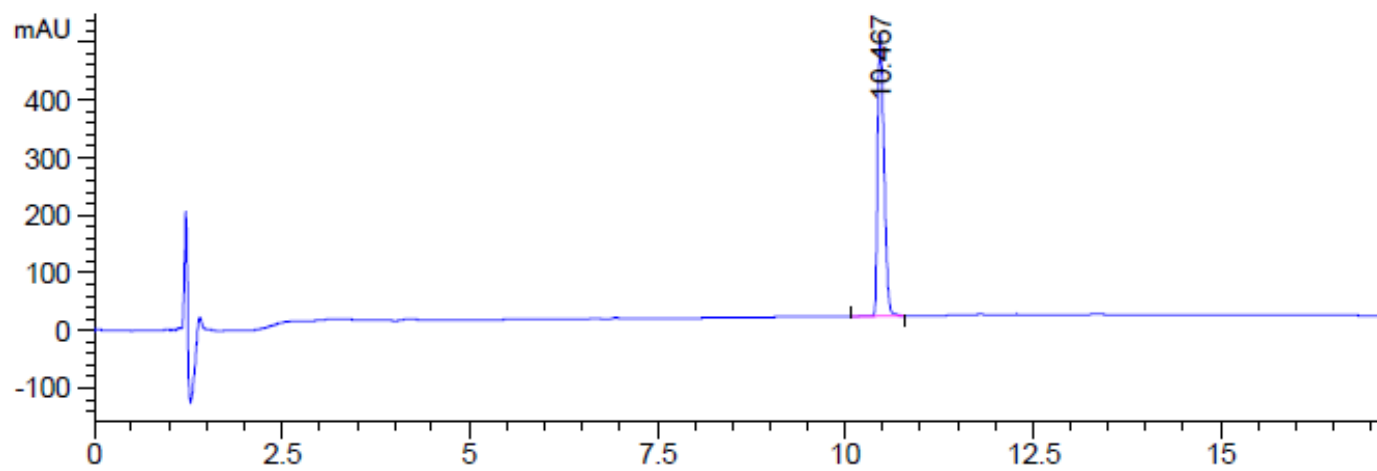
3MeValAc-LLLRVK-Amba



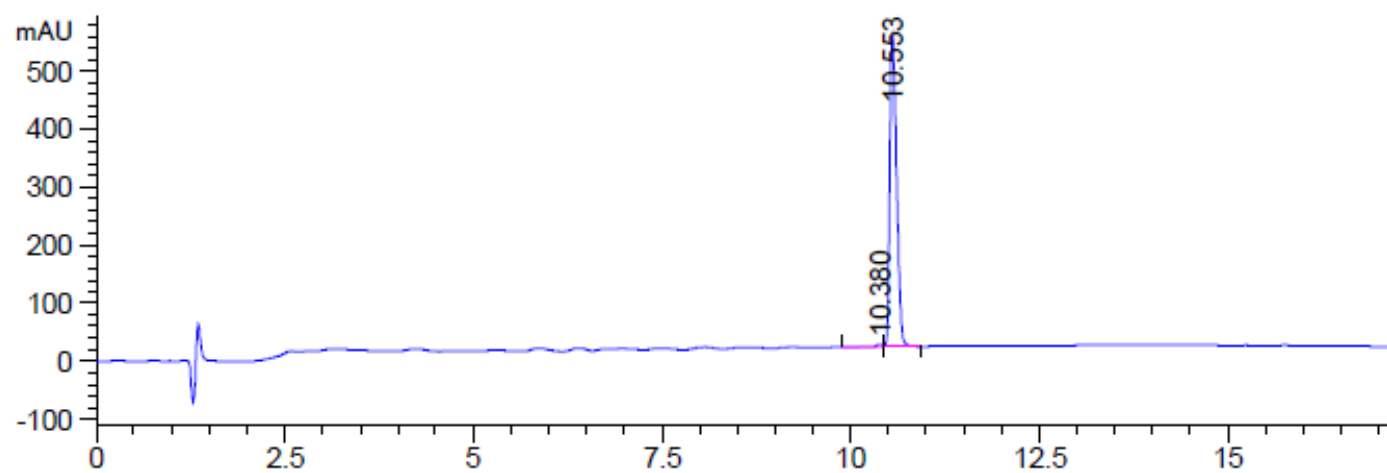
4-AMePhac-LLLRVK-Amba



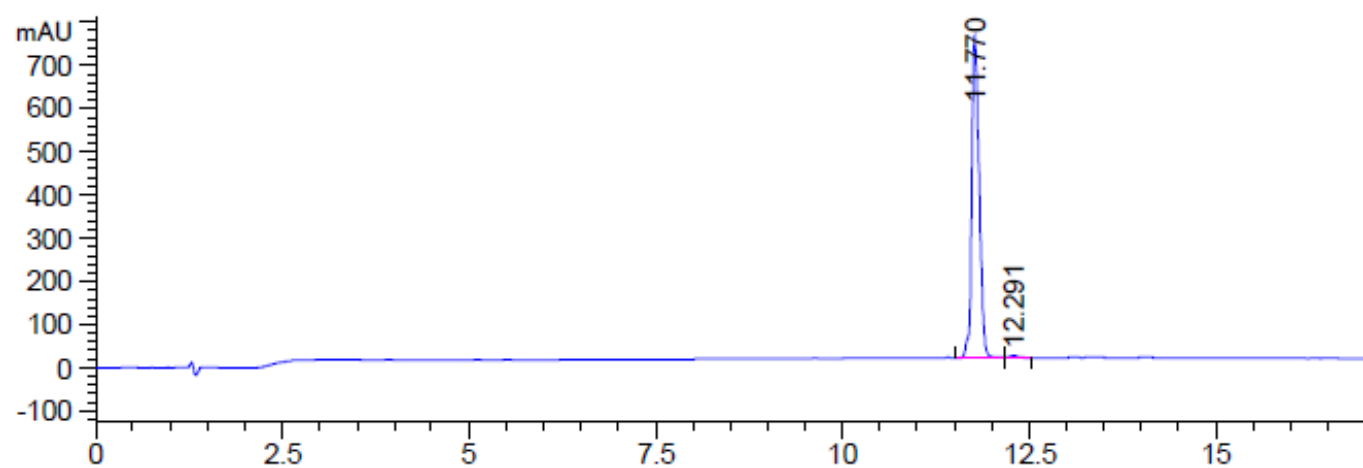
Phac-LLLLRVK-Amba



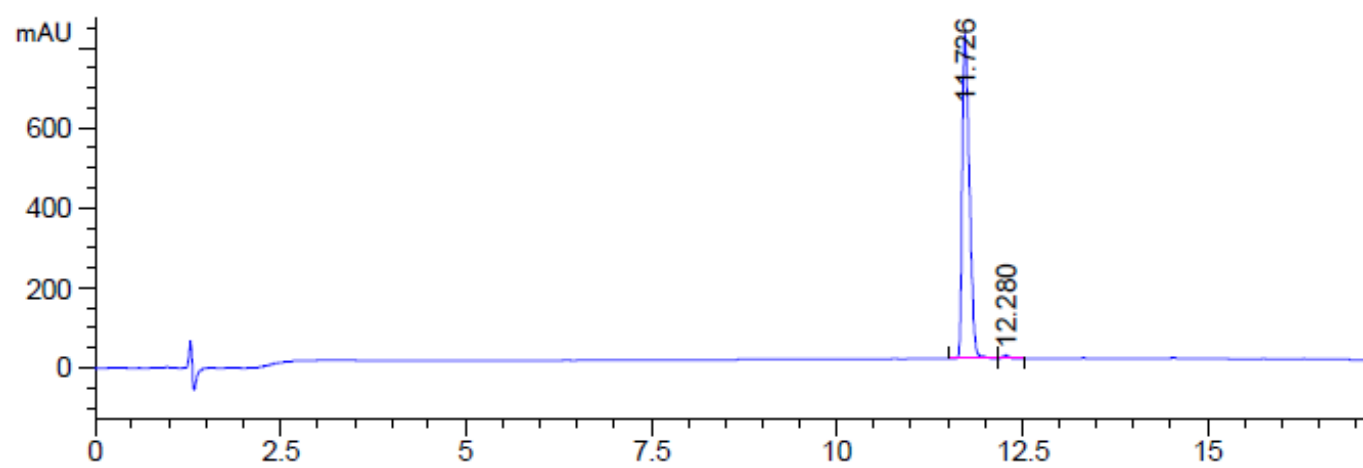
Phac-[DLeu]LLLLRVK-Amba



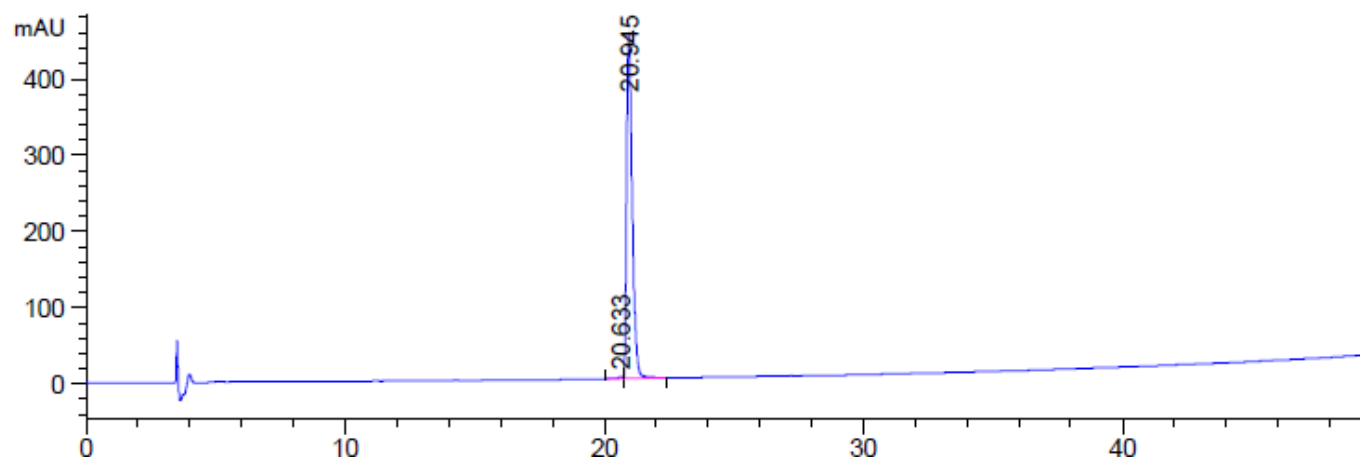
DiPhac-LLLLRVK-Amba



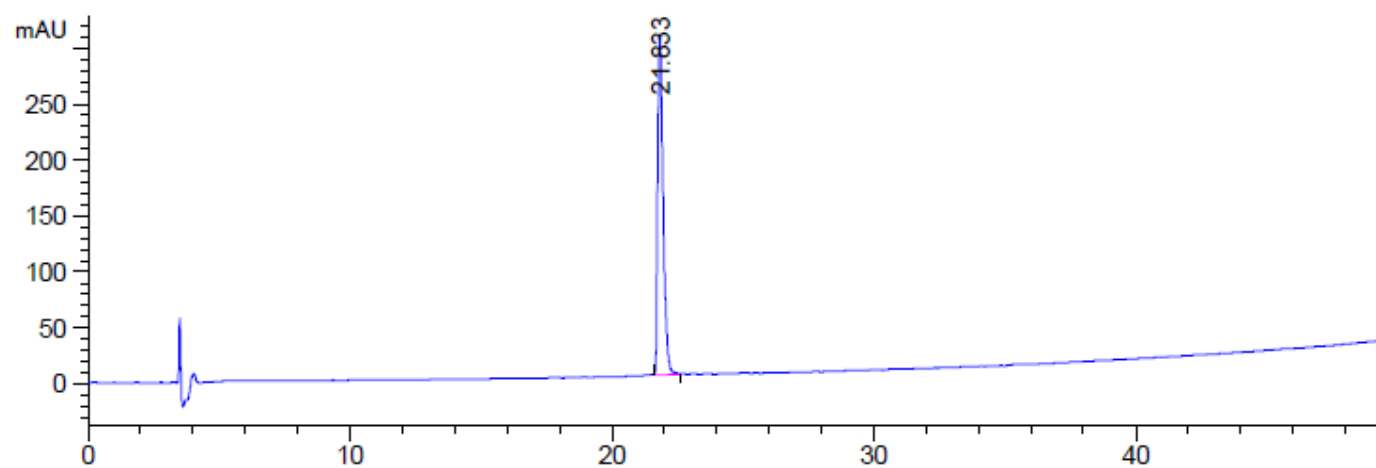
DiPhac-[DLeu]LLLLRVK-Amba



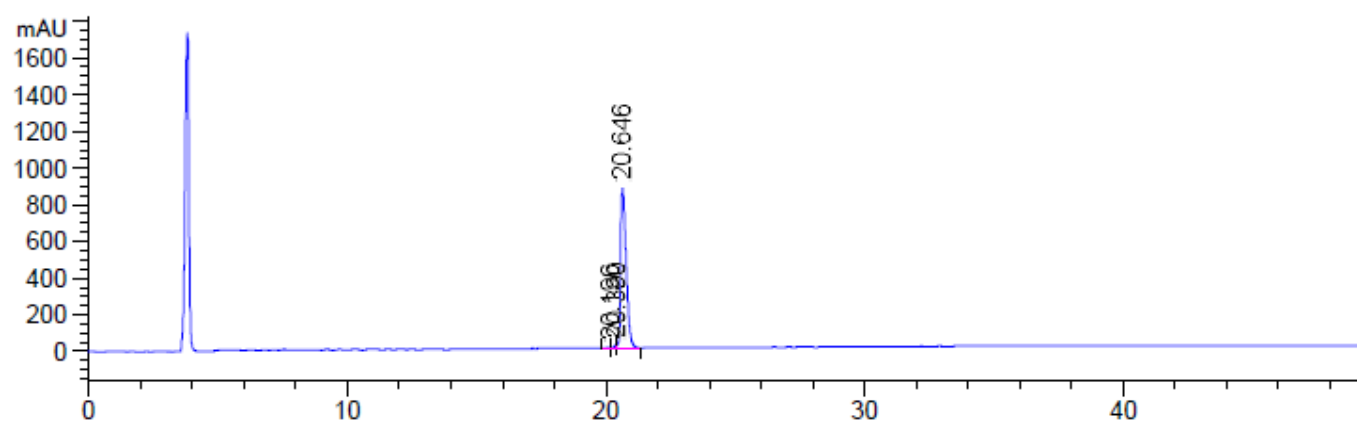
3-Apaa-LLLLRVK-Amba



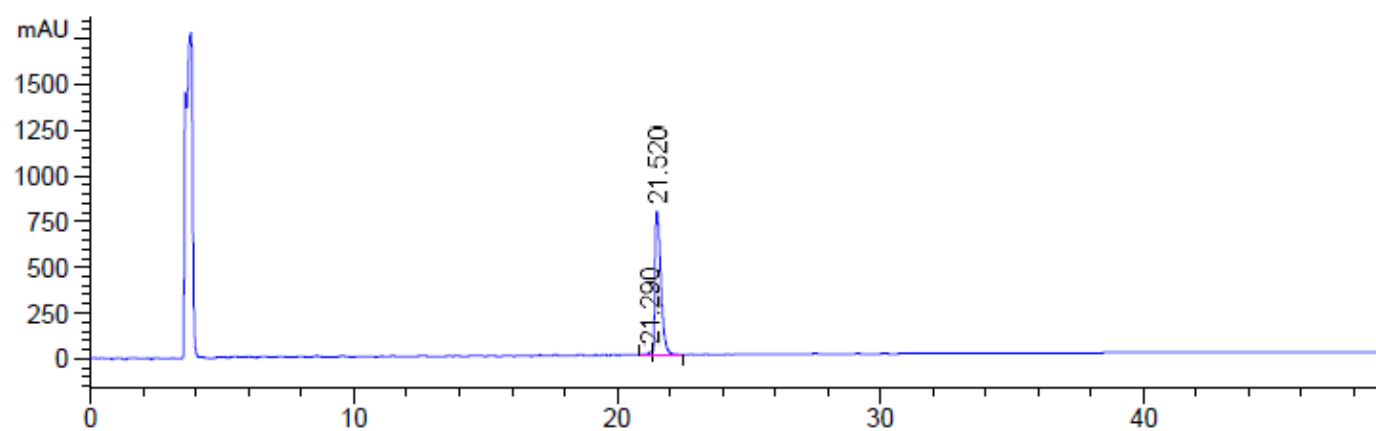
3-Apaa-[DLeu]LLLRVK-Amba



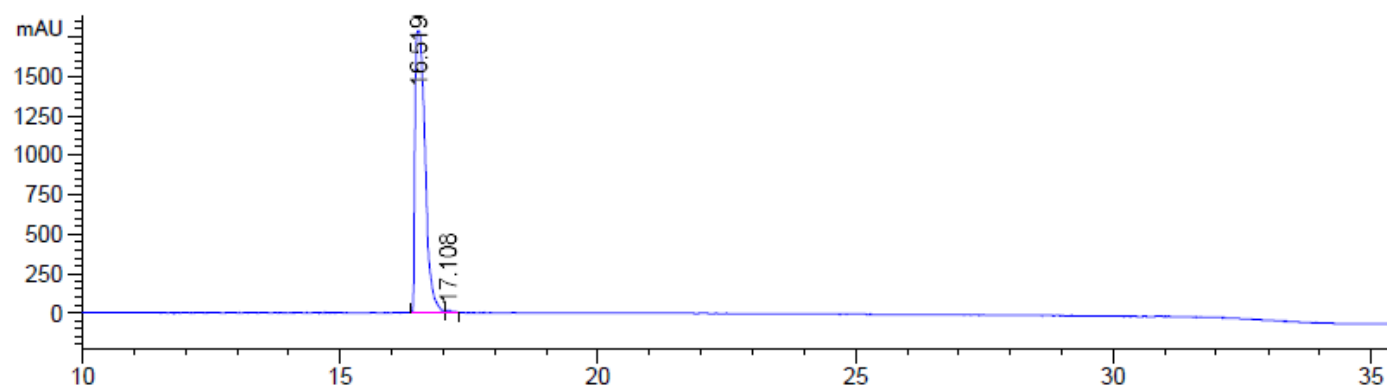
4-AMePhac-LLLLRVK-Amba



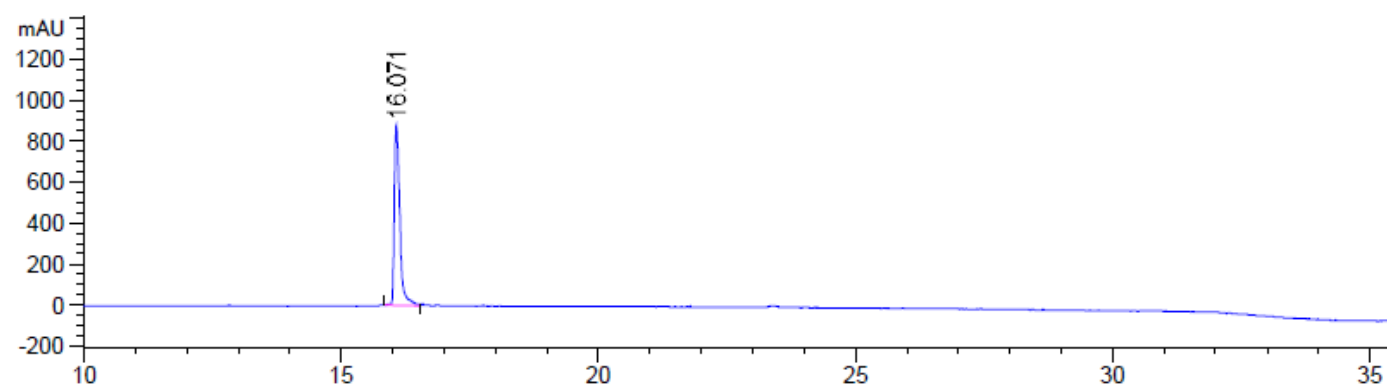
4-AMePhac-[DLeu]LLLRVK-Amba



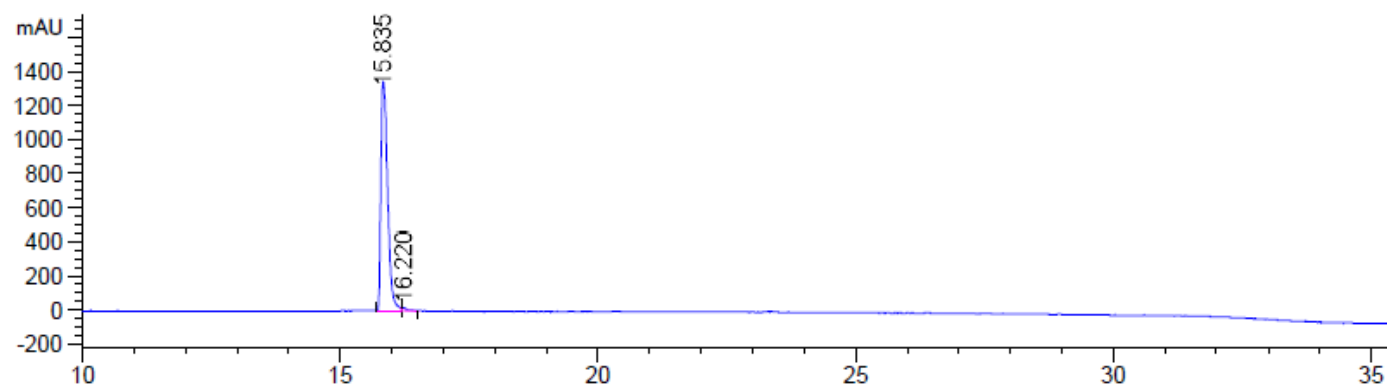
3-Apaa-[DLeu][HoLeu]LL[HoLeu]R[Tle ML]K-Amba



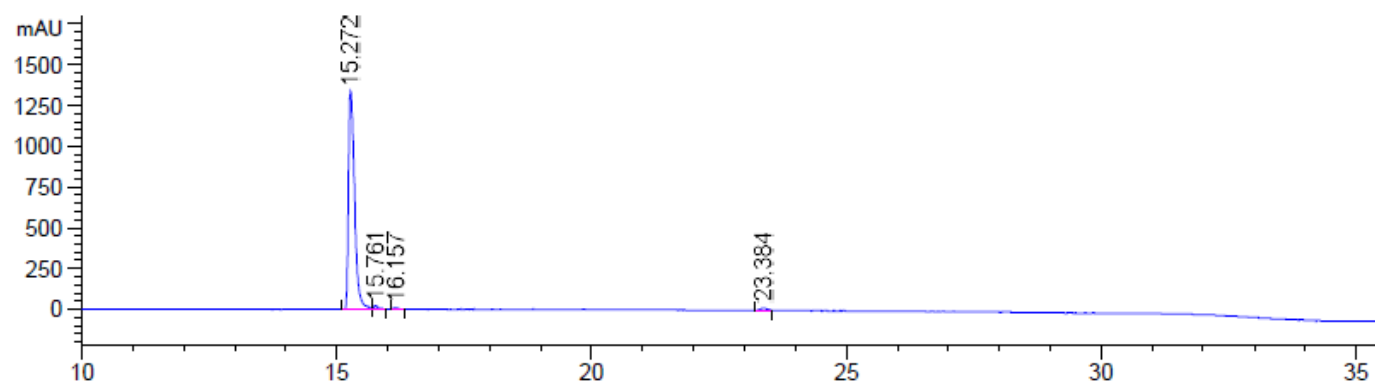
3-Apaa-[DLeu][HoLeu]LL[Nle]R[Tle ML]K-Amba



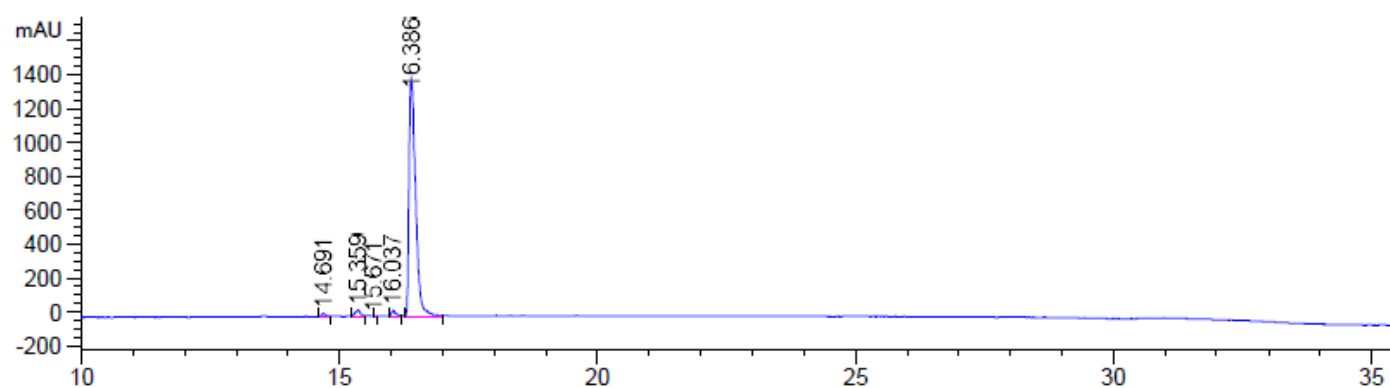
3-Apaa-[DLeu][Nle]LL[HoLeu]R[Tle ML]K-Amba



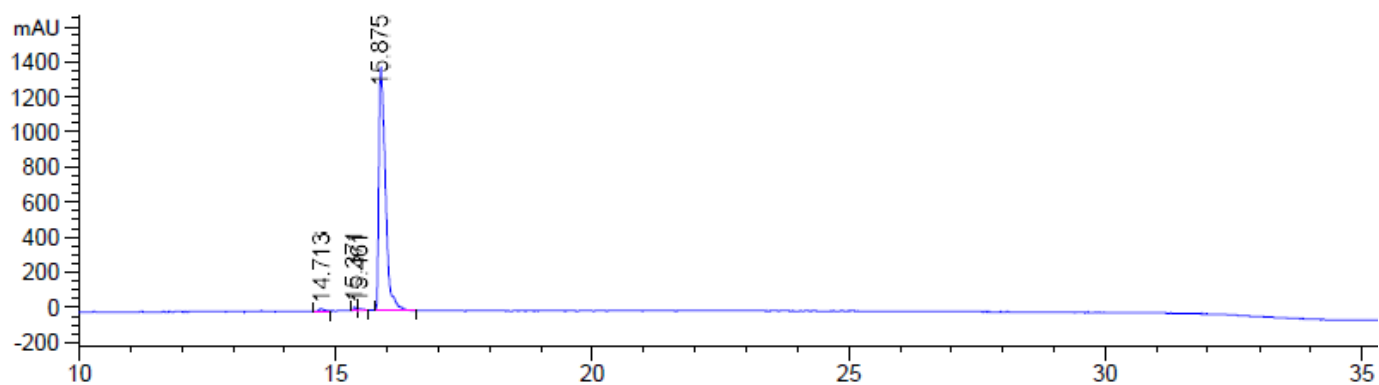
3-Apa-[DLeu][Nle]LL[Nle]R[Tle ML]K-Amba



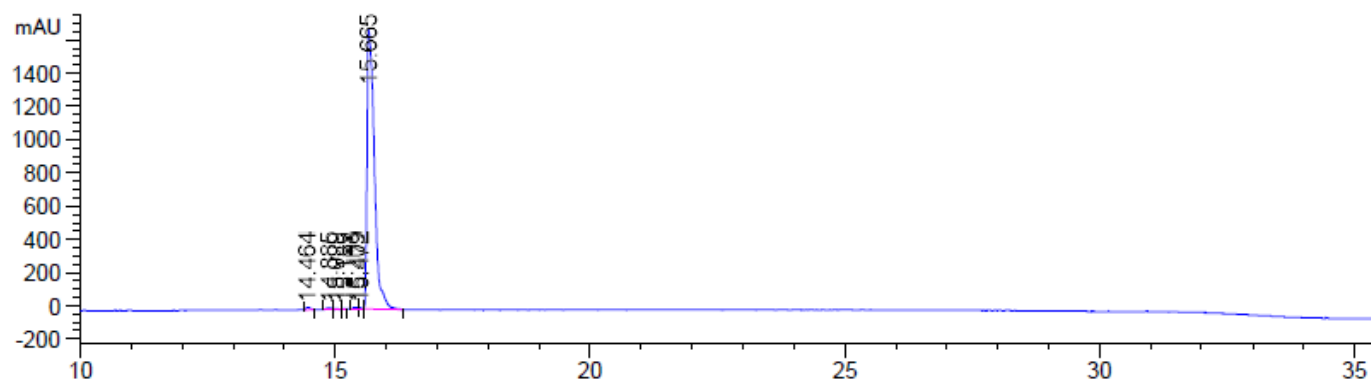
4-AMePhac-[DLeu][HoLeu]LL[HoLeu]R[Tle ML]K-Amba



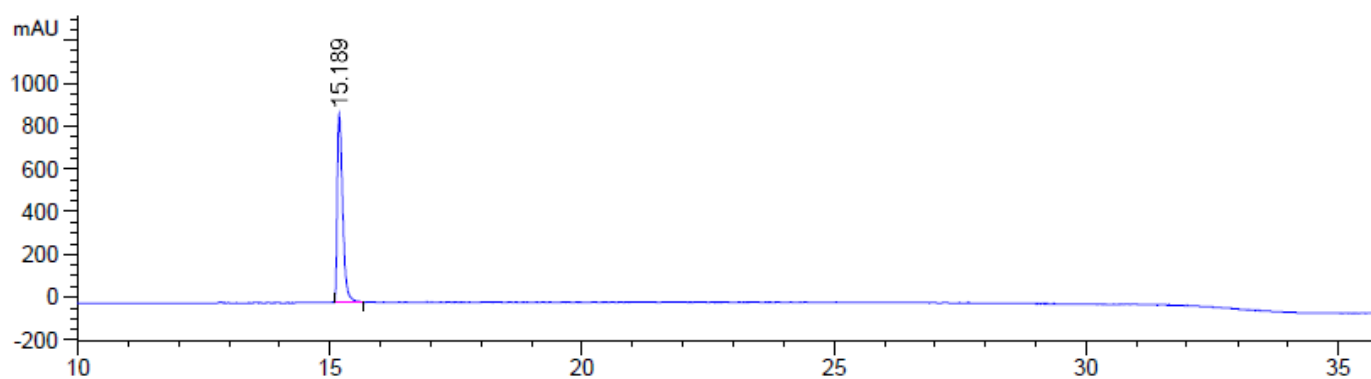
4-AMePhac-[DLeu][HoLeu]LL[Nle]R[Tle ML]K-Amba



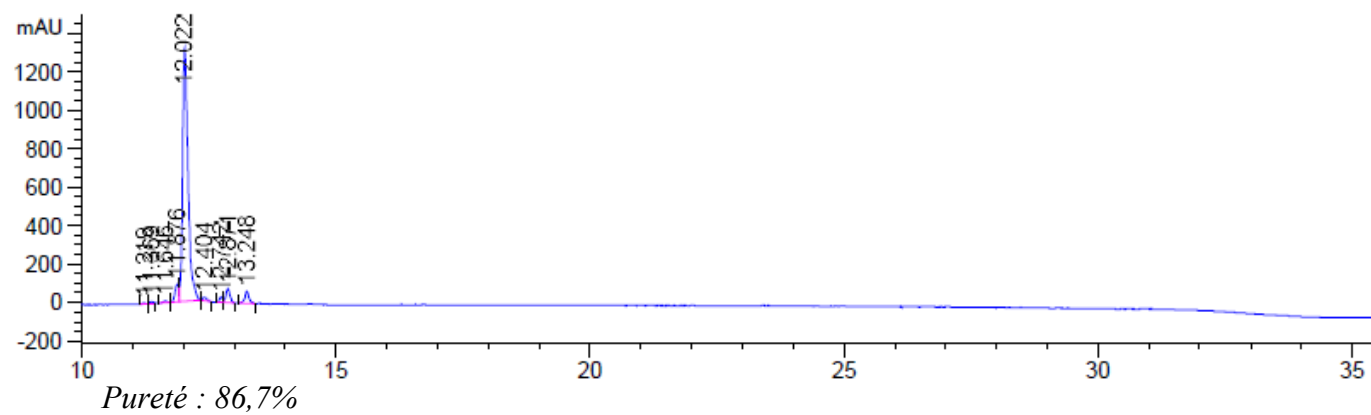
4-AMePhac-[DLeu][Nle]LL[HoLeu]R[Tle ML]K-Amba



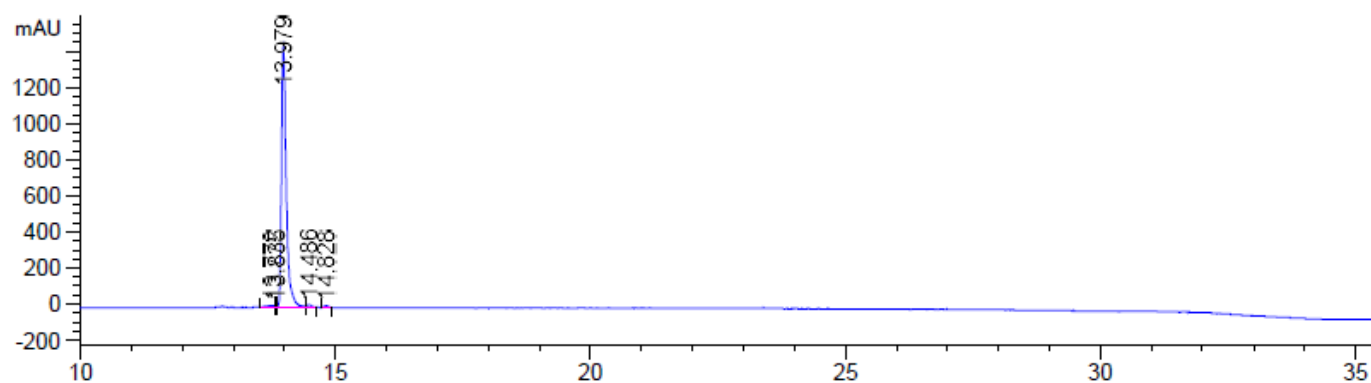
4-AMePhac-[DLeu][Nle]LL[Nle]R[Tle ML]K-Amba



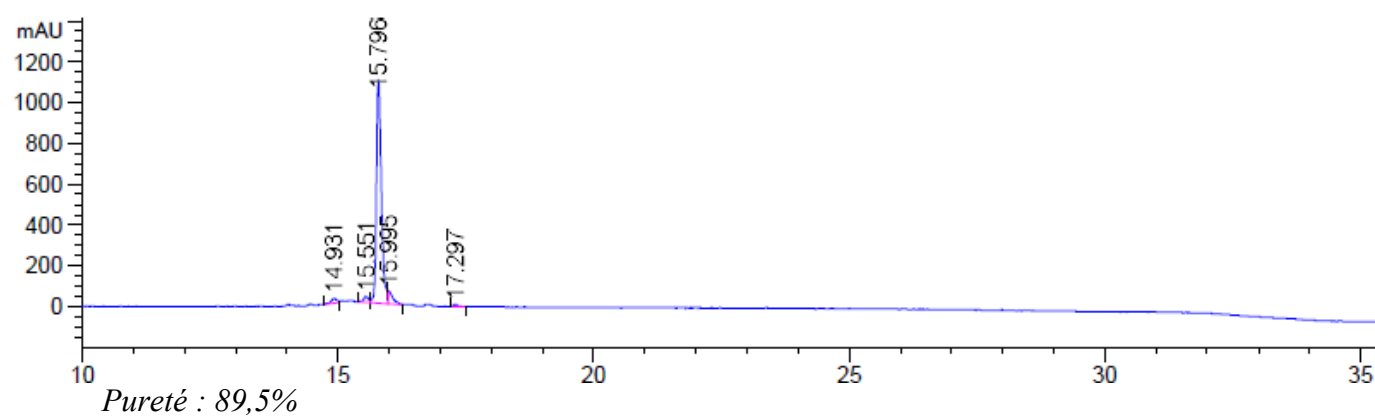
FITC-βAla-RVK-Amba



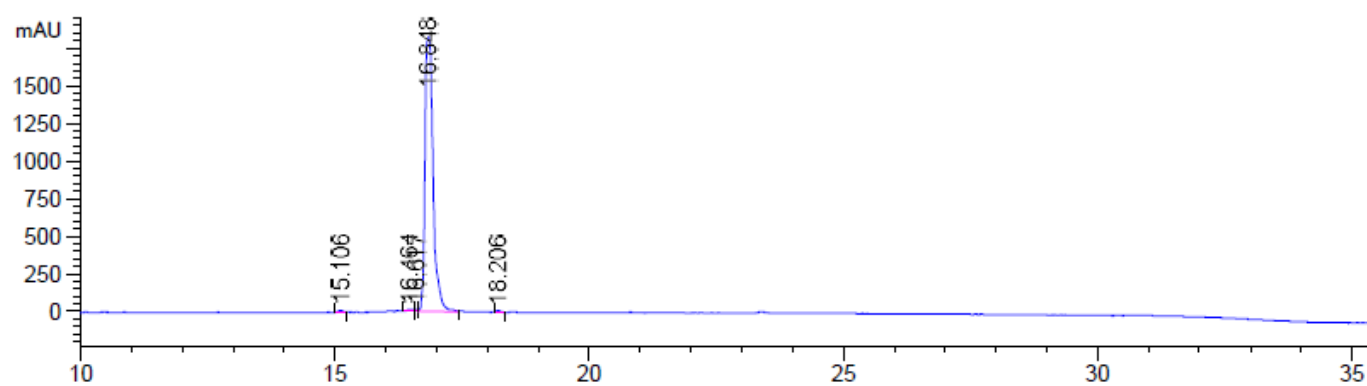
FITC- β Ala-LRVK-Amba



FITC- β Ala-LLRVK-Amba

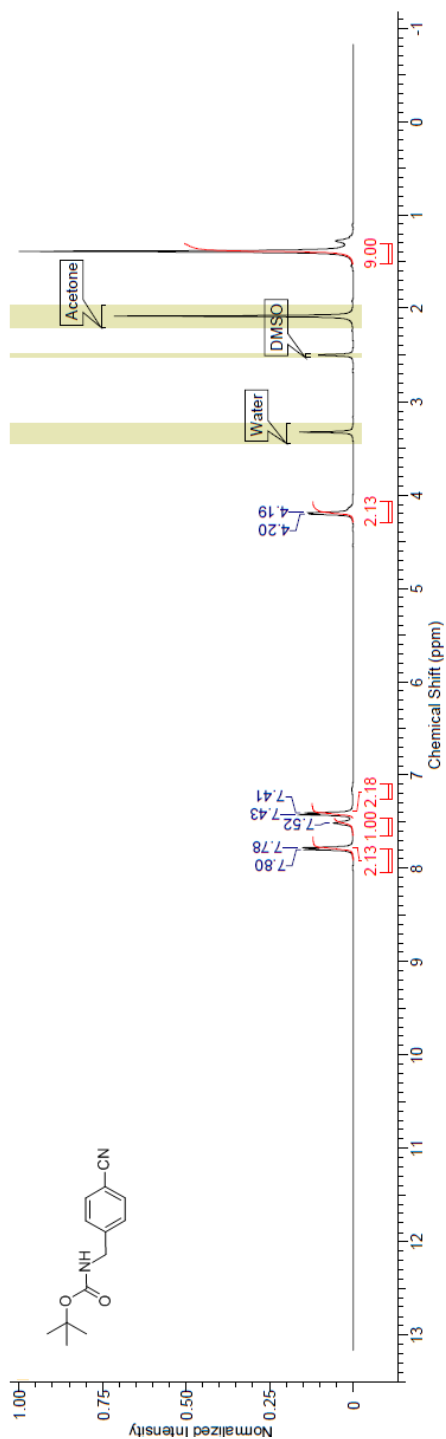


FITC- β Ala-LLL RVK-Amba



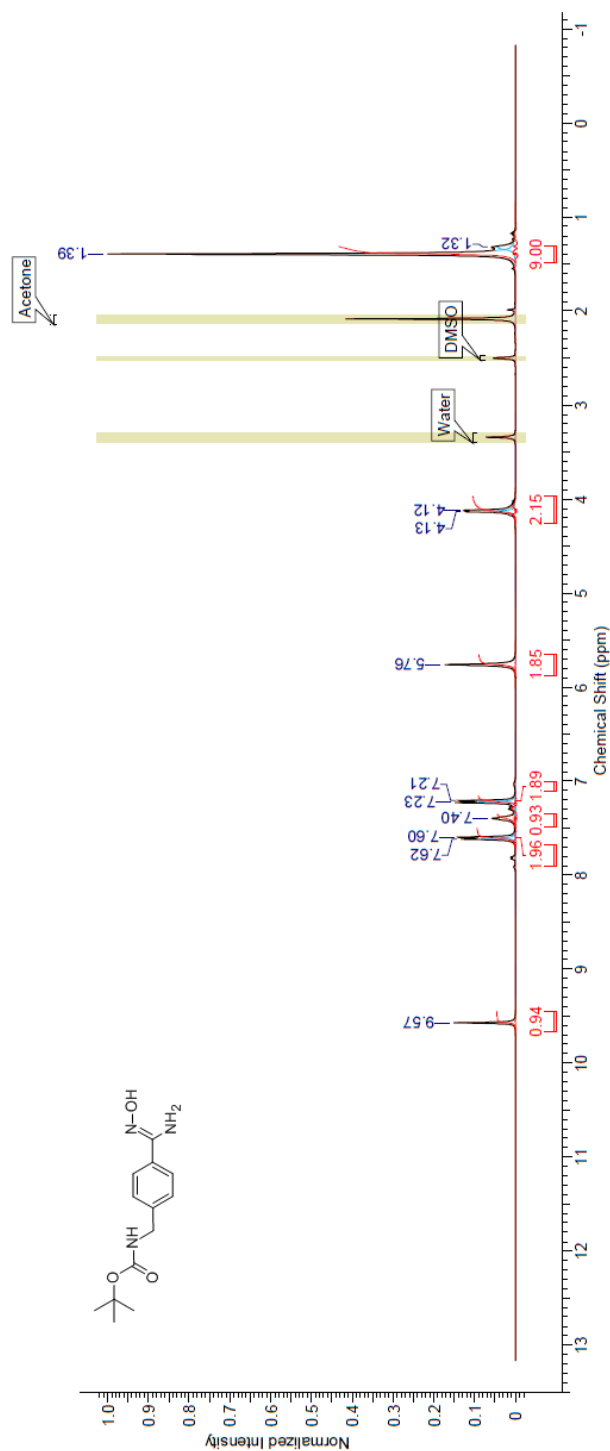
ANNEXE 4 : SPECTRES DE RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE

tert-butyl 4-cyanobenzylcarbamate (^1H)



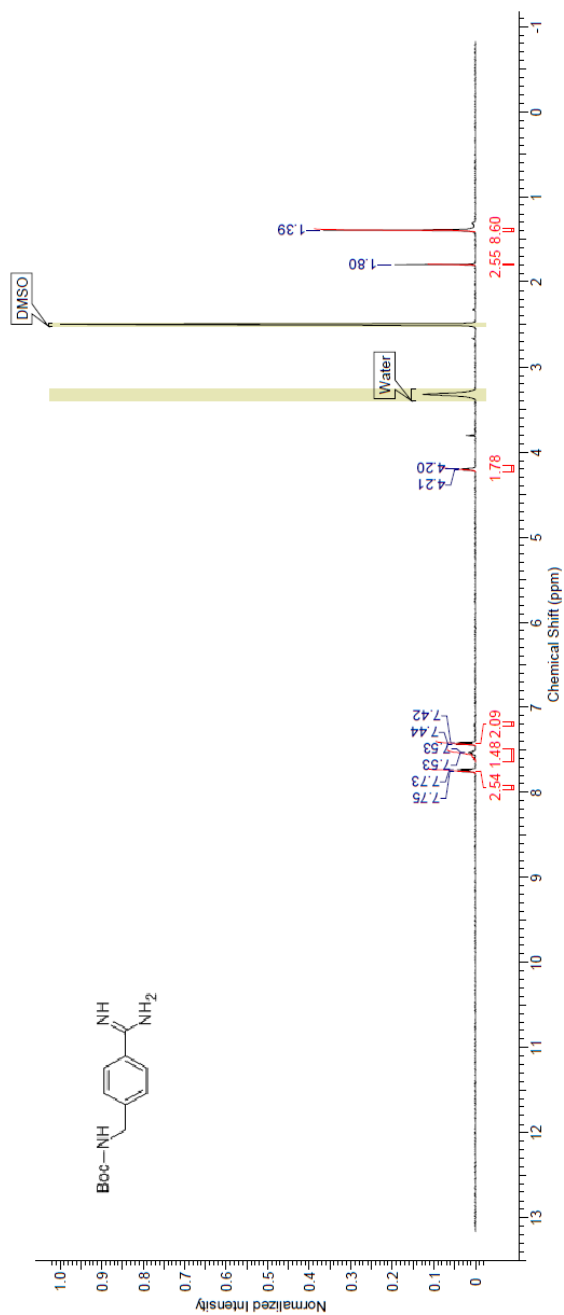
^1H NMR (400 MHz, DMSO- D_6) (ppm) 7,79 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz), 7,52 (s, 1H), 7,42 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz), 4,20 (d, 2H, $J = 5.5$ Hz), 1,39 (s, 9H).

tert-butyl 4-(N'-hydroxycarbamimidoyl)benzylcarbamate (^1H)



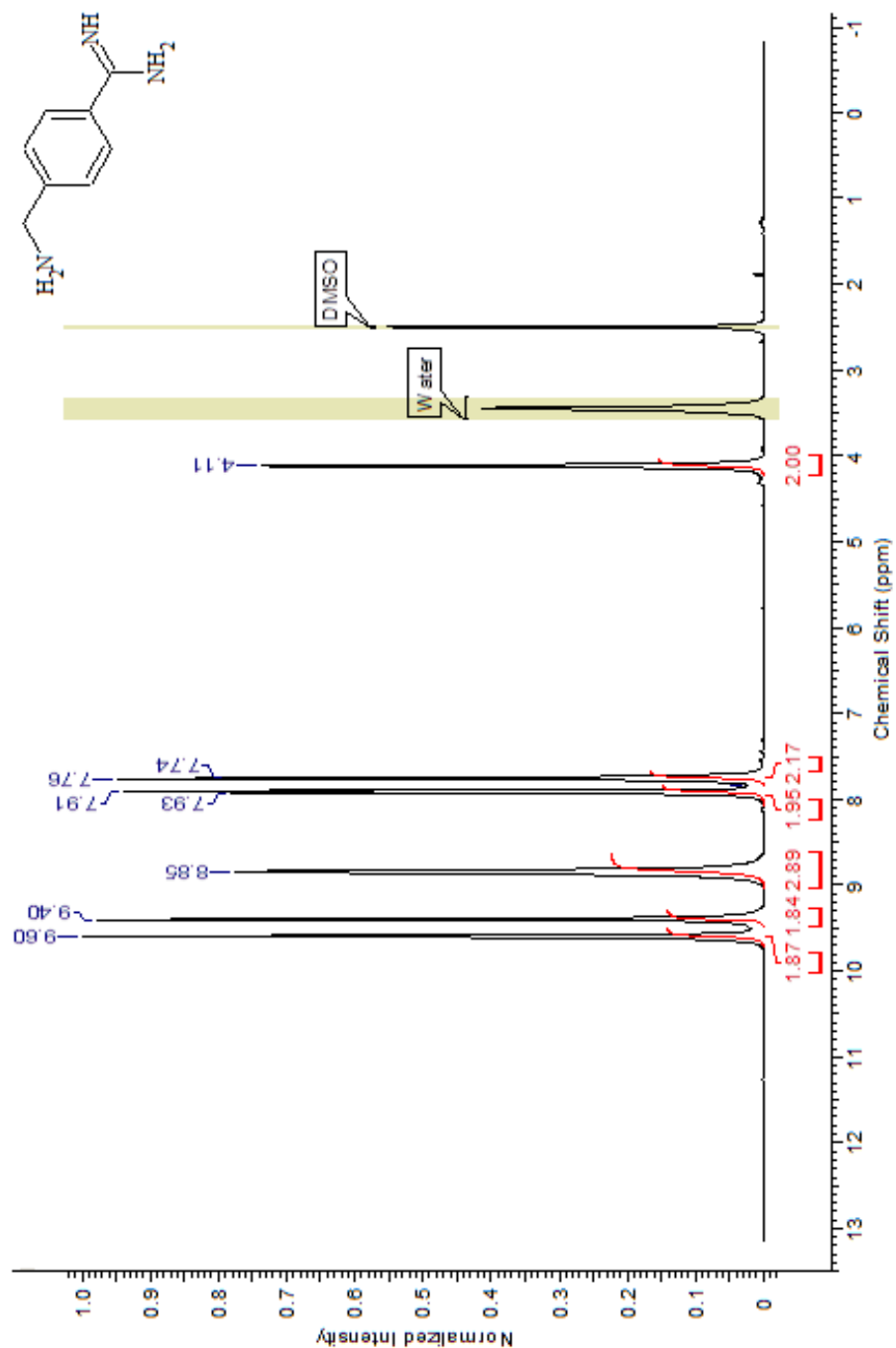
^1H NMR (400 MHz, DMSO- D_6) (ppm) 9,57 (s, 1H), 7,61 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz), 7,40 (s, 1H), 7,22 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz), 5,75 (s, 1H), 4,12 (d, 2H, $J = 5.3$ Hz), 1,39 (s, 9H).

tert-butyl 4-carbamimidoylbenzylcarbamate (¹H)



¹H NMR (400 MHz, DMSO-D₆) (ppm) 7,74 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz), 7,53 (m, 2H), 7,43 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz), 4,21 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz), 1,80 (s, 2H), 1,39 (s, 9H).

4-amidinobenzylamide (^1H)¹



^1H NMR (400 MHz, DMSO- D_6) (ppm) 9,60 (s, 2H), 9,40 (s, 2H), 8,85 (s, 3H), 7,91 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz), 7,76 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz), 4,11 (s, 2H).

¹ Comme il s'agit d'un produit connu et caractérisé, seule la RMN ^1H a été utilisée lors de la validation du produit final. Le spectre RMN ^{13}C (dont cette synthèse est fortement inspirée) est disponible dans Kwiatkowska *et al*, *J Med Chem*, **2012**.